

A nemlineáris mikroszkópiában használt impulzusüzemű lézerek diagnosztikai célú felhasználása és potenciális egészségügyi kockázatainak vizsgálata

Doktori értekezés

Haluszka Dóra

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Wikonkál Norbert, MTA doktora, egyetemi tanár

Konzulens: Dr. Szipőcs Róbert – MTA Wigner, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Csík Gabriella, PhD, egyetemi docens

Dr. Emri Gabriella, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona,

MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Paku Sándor, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Varga Erika, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1.Bevezetés.....	4
1.1 Nemlineáris optikai folyamatok	5
1.2 A humán bőr karakterisztikája a különböző nemlineáris képalkotó módszerek alkalmazásával	10
1.3 Nemlineáris mikroszkópiai módszerek alkalmazási lehetőségei a dermatológiában	13
1.4 Nemlineáris mikroszkópiai módszerek biztonságtechnikája.....	21
1.5 Kereskedelmi forgalomban kapható klinikai berendezések.....	24
2. Célkitűzések.....	25
3. Módszerek	29
4. Eredmények.....	40
4.1 Nanomedicinák bőrben történő penetrációjának nyomon követése <i>in vivo</i> nemlineáris mikroszkópiával	40
4.2 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata <i>in vivo</i> SHG és <i>ex vivo</i> CARS módszerrel, genetikailag módosított leptin deficiens ob/ob egereken.....	43
4.3 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata <i>in vivo</i> SHG és <i>ex vivo</i> CARS módszerrel, különböző diétán tartott C57BL/6 egereken	47
4.4 Ultrarövid impulzusú titán-zafír szilárdtest lézer és ytterbium optikai szállézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata	53
5. Megbeszélés	59
6. Következtetések.....	67
7. Összefoglalás	70
8. Irodalomjegyzék.....	72
9. Saját publikációk jegyzéke	83
9.1 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk	83
9.2 Az értekezés témájától független publikációk	83
10. Köszönetnyilvánítás	84

Rövidítések jegyzéke:

(6-4)-PD: pirimidin-(6-4)-pirimidon

AGE: advanced glycated endproducts

BCC: basal cell carcinoma

BMI: body mass index

CARS: coherent anti-Stokes Raman scattering

CHO: chinese hamster ovary cells

CPD: ciklobután pirimidin dimer

CT: komputer-tomográfia

DTR: diphtheria toxin receptor

EDJ: epidermal-dermal junction

FFA: free fatty acid

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

GFP-BM: green fluorescent protein – bone marrow

JAK/STAT: Janus kinase/Signal Transducer and Activation of Transcription

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MED: minimál erythema dózis

MMP: mátrix metalloproteináz

MRI: Magnetic Resonance Imaging

NADH: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NER: nukleotid excíziós repair

NPs: nanoparticles

PEIm: polietilénimin-mannóz

PLGA: poly(D,L-lactide-co-glycolide)

PI3K/Akt: foszfoinozitol-3-kináz

SCC: squamous cell carcinoma

SHG: second harmonic generation

THG: third harmonic generation

Ti:S: titán-zafír

TPEF: twophoton excitation fluorescence

UH: ultrahang

UV: ultraviola sugárzás

WT: wild type

Yb: ytterbium

ZnO: cink-oxid

1. Bevezetés:

A technika fejlődésének köszönhetően az utóbbi évtizedekben a háromdimenziós (3D) képalkotó módszerek egyre inkább elterjedtek a mindennapi diagnosztikában és az alapkutatásokban egyaránt. Különböző szoftverek segítségével ma már a hagyományos CT, MRI és ultrahang (UH) készülékek is alkalmasak háromdimenziós képalkotásra, melyek segítségével pontosabbá vált a különböző betegségek detektálása, követése. Napjainkban a bőrgyógyászati kórképek diagnosztizálására az ultrahang technika a legelterjedtebb, mely a bőr malignus folyamatainak követését teszi lehetővé [1]. Az ép bőr ultrahang-morfológiai képén az epidermisz, dermisz és szubkutisz jól elkülöníthető egységeket képeznek. Melanoma malignum esetében az UH vizsgálat alkalmas a tumor mélységi terjedésének meghatározására, a sentinel nyirokcsomók vizsgálatára és a melanomák posztoperatív, szekunder folyamatainak követésére [2-4]. Az UH vizsgálatok továbbá szükségesek lehetnek a különböző basalioma formák elkülönítésében, illetve műtétek tervezésénél a tumorhatárok feltérképezésében, valamint a cutan lymphomákhoz kapcsolódó elváltozások azonosításában is [5, 6].

A dermatológiai képalkotó diagnosztikában, az utóbbi években egyre elterjedtebbé vált a konfokális mikroszkópia alkalmazása, mely alkalmas a bőr felső rétegeinek *in vivo* leképezésére [7]. A módszer előnye, hogy nagy felbontású digitális képek készíthetők, illetve az „optikai szeletelés” alkalmazásával a különböző síkokban készült horizontális képek összeillesztésével egy adott terület 3D-s rekonstrukciója is lehetséges. A technika hátránya azonban, a nagy méretű és nagy tömegű elváltozások képalkotása, valamint a csekély, körülbelül 200 μm -nyi penetrációs készség [8]. A kereskedelmi forgalomban kapható *in vivo* konfokális mikroszkópok (VivaScope) nagy mérete miatt a nehezen elérhető helyeken – mint például az arc – található elváltozások vizsgálata nehezen megoldható.

Az 1990-es években egy új képalkotó módszer, a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópia hozott áttörést a 3D-s képalkotásban, mely a nemlineáris optikai alapokon működik [9]. A nemlineáris optika az optika azon területe, amikor az optikai közeg abszorpciós és terjedési jellemzői már függenek a beeső fény intenzitásától, és a fényterjedést különböző többfotonos folyamatok is kísérhetik. Precízebben fogalmazva: a közeg polarizáltsága már nemlineárisan függ a beeső fény

térerősségétől, a magasabbrendű polarizációs tagok már jelentősen eltérnek a nullától. A polarizáció függése a térerősségtől hatvány formájában:

$$P = \epsilon_0 (\chi_1 E + \chi_2 E^2 + \chi_3 E^3 + \dots)$$

ϵ_0 : vákuum permittivitása

χ_1 : lineáris susceptibilitás

χ_2, χ_3 : nemlineáris optikai koefficiensek

A nemlineáris optikai jelenségekkel leggyakrabban impulzusüzemű, módusszinkronizált piko-, vagy femtoszekundumos lézerek működése vagy alkalmazása esetén találkozhatunk – gyakran a módusszinkronizált működés is nemlineáris folyamatokon alapul. Ezen ultrarövid impulzusú lézerek esetében a fénytjeljesítmény rövid, ps-os vagy szub-ps-os időablakokban koncentrálódik, még a lézerek ismétlési frekvenciája tipikusan 1 MHz és 100 MHz közé esik. Ez szemléletesebben megfogalmazva azt jelenti, hogy az egyes (~1 ps-os) lézerimpulzusok „hossza” ~0,3 mm-es tartományba esik, míg az egyes lézerimpulzusok „követési távolsága” 300 és 3 m között van, így a lézerimpulzusok pillanatnyi fényintenzitása 4-6 nagyságrenddel meghaladja a hasonló átlagteljesítményű folyamatos üzemű lézerekét.

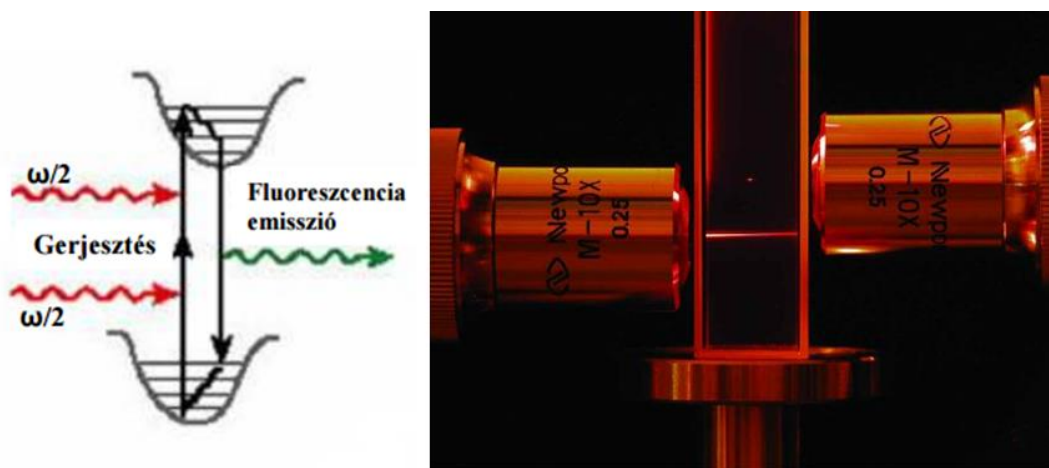
1.1 A nemlineáris optikai folyamatok

A nemlineáris optikai folyamatok között számos olyan jelenség került alkalmazásra, mely alkalmas biológiai minták *in vivo* vizsgálatára. Ilyen például a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (TPEF), a másodharmonikus keltés (SHG), vagy a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS). Használatukkal gyakorlatilag a bőr teljes keresztmetszete láthatóvá tehető, ezzel számos komponens detektálható, amik segíthetnek a különböző dermatológiai kórképek diagnosztizálásában.

1.1.1 Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia

A kétfotonos gerjesztés elméleti alapjait Maria Göppert Mayer írta le az 1930-as években [10]. A jelenséget azonban először Kaiser és Garrett erősítette meg

kísérleteiben, 1963-ban [11]. A kétfotonos gerjesztés során a gerjesztendő molekulába egyszerre két foton azaz fénykvantum abszorbeálódik, így energiájuk összeadódik (1. ábra/bal oldalon). Ehhez tipikusan egy nagy intenzitású lézer fényforrás szükséges, mely képes a megfelelő foton sűrűséget előállítani, hiszen a kétfoton abszorpciós hatáskeresztmetszet (a folyamat valószínűsége) nagyságrendekkel kisebb, mint az egyfotonos folyamatoké.

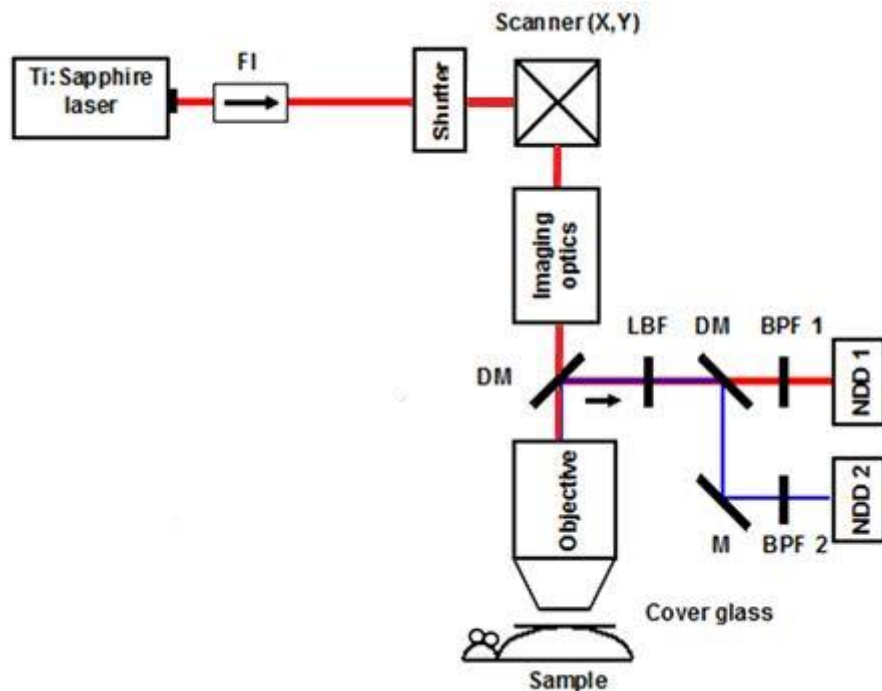


1. ábra Bal oldalon: A kétfoton effektus energia diagramja: a gerjesztés során az adott molekulában egyszerre két foton nyelődik el, ezért energiájuk összeadódik $\omega/2 + \omega/2 = \omega$. Jobb oldal: az egyfotonos és kétfotonos abszorpció összehasonlítása. A küvetta alsó részén a konfokális fluoreszcens mikroszkópban is használt nagy energiájú (rövid hullámhosszú) lézer fényforrással folyamatosan gerjesztik a festékkoldatot, még felül rövid impulzusú infravörös lézerfényvel történik a megvilágítás. Látható, hogy kétfoton abszorpció esetén (felül) a fluoreszcencia csak a fókuszfoltban jön létre, míg az egyfotonos gerjesztés a minta fókuszfolton kívül eső részeit is gerjeszti, ami fotokémiai folyamatok révén jelentősen károsíthatja a vizsgált mintát. Kép forrása: <http://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=951>

A kétfoton gerjesztés jelenségének leírását követően még évtizedeknek kellett eltelnie, mire elkészült az első pásztázó kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp. Denk, Webb és munkatársai ezzel új utat nyitottak meg a háromdimenziós mikroszkópiás képalkotás területén [9]. A mérés úgy történik, hogy egy galvanoszkenner segítségével kétdimenzióban pásztázott gerjesztő lézerfényt egy pontra lefókuszálunk, itt a mintát gerjesztjük, és az így előállított optikai, fluoreszcens jelet egy érzékeny fotodetektor segítségével detektáljuk (2. ábra).

A módszer egyik fontos előnyét az jelenti, hogy a gerjesztő lézer fényforrás csak egy kicsi, kb $\sim 0,3 \mu\text{m}$ átmérőjű és $\sim 0,1$ femtoliter térfogatú fókuszpontban hozza létre a vizsgálni kívánt anyag kétfotonos gerjesztéséhez szükséges energiasűrűséget, (tipikusan csak egy 0,1-1 ps-os időintervallumon belül), és a lézer mintára eső átlagteltjesítménye továbbra is csak a néhány mW-os tartományban tartható (1. ábra/bal). A fluoreszcens

képalkotás e módszere – a fluoreszcens konfokális mikroszkópokban alkalmazott egyfotonos gerjesztéssel ellentétben – nem gerjeszti a minta fókuszpontján kívül eső részeit, így a sejtkárosító, fotokémiai hatásokat, melyek eddig jelentősen korlátozták a lézer sugárral történő *in vivo* vizsgálatokat, jelentősen csökkenteni tudja.

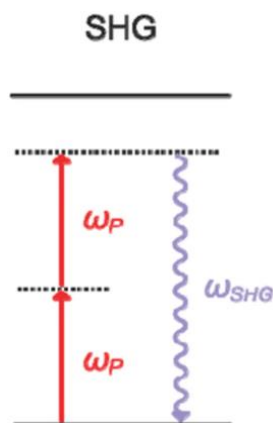


2. ábra A pásztázó kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp sematikus felépítése (saját ábra): a minta gerjesztéséhez használt infravörös lézer (Ti:Sapphire laser) impulzusokban adja le az energiáját, nanoszekundumos impulzuskövetési távolságokkal. A lézerfény két egymásra merőlegesen (x,y) mozgó tükör segítségével pásztázza a mintát (Scanner x,y). A gerjesztés során keletkező fluoreszcens jelet a dikroikus tükör (DM) választja szét a gerjesztő lézersugárzástól, majd további sáváteresztő szűrők (BPF1, BPF2) és fotoelektronsokszorozók (NDD1, NDD2) segítségével detektáljuk a jelet.

A módszer további előnye, hogy az alkalmazott közel infravörös (700-1300 nm) hullámhossz tartományú fény a bőr mélyebb rétegeibe is képes behatolni, így akár ~1 mm mélységben is lehetséges a képalkotás. A lézer fényforrás hangolhatósága lehetővé teszi, hogy a vizsgálni kívánt kromoforra jellemző optimális gerjesztési hullámhosszt beállítsuk, ezáltal a képalkotás jobb minőségűvé, továbbá szelektívvé is válik. Kétfoton gerjesztéssel a bőrben többek között a keratin, melanin, nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és az elasztin is detektálható [12].

1.1.2 Másodharmonikus keltés

Másodharmonikus keltés (SHG) a nem szimmetrikus szerkezettel rendelkező molekulák nagyfokú polarizációja során jön létre, ami a gerjesztő lézerfény egy részének frekvenciakétszerezését eredményezi (3. ábra).



3. ábra A másodharmonikus keltés folyamata. A másodharmonikus keltés során 2 db ω_P frekvenciájú „foton”-ból 1 db ω_{SHG} frekvenciájú foton keletkezik.

Ez a módszer a hosszú élettartalmú proteinek, mint például a kollagén, mikrotubulusok vagy az izom miozin fehérjéinek detektálására alkalmas [13-15].

Az SHG fizikai alapjait 1961-ben definiálták, de az első biológiai mintán történő kísérleteket 1986-ban Freund hajtotta végre, amikor a patkányfarok kollagén szerkezetét és orientációját vizsgálta [16].

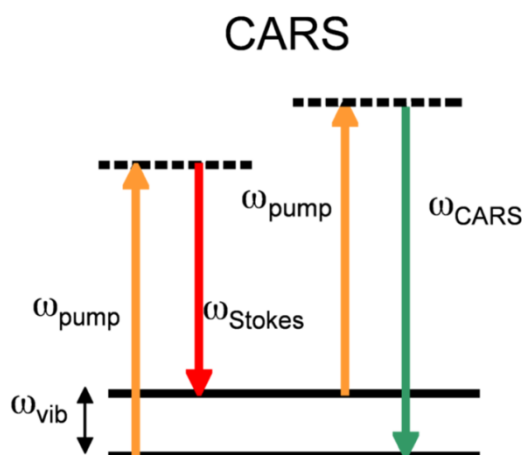
A dermiszben található kollagén bőrünk rugalmasságáért felelős struktúrprotein, melynek minősége és mennyisége mind az intrinzik, mind az extrinzik öregedés folyamán változik. Ezek ismeretében nem meglepő, hogy mára számos publikáció elérhető, mely a bőr öregedési folyamatait, illetve potenciális kozmetológiai hatóanyagok bőrfiatalító hatását vizsgálja *in vivo* SHG módszerrel [17-21].

Azonban nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a fontos tényezőt sem, hogy a dermális kollagén szerkezete a bőrtumorok inváziójának vizsgálatánál igen fontos paraméter lehet. A bőr daganatainak közös jellemzője és a tumor inváziójának kulcsfontosságú mozzanata az extracelluláris mátrix fehérjék, például az I. típusú kollagén degradációja a mátrix metalloproteáz (MMP) enzim család aktivitásán keresztül [22, 23].

1.1.3 Koherens anti-Stokes Raman szórás

A CARS módszer az SHG technikával körülbelül egyidős, hiszen története szintén az 1960-as években indult, amikor P.D. Maker és R.W. Terhune pulzáló rubin lézert használva vizsgáltak különböző anyagok harmadrendű folyamatait. Ekkor a módszer még csak „tree-wave mixing”-nek nevezték [24]. Érdekesség, hogy a módszer nevének, a „CARS” betűszónak látszólag semmi köze a gépkocsikhoz, pedig a fent ismertetett kísérleteket a Ford Motor gyár kutatólaboratóriumában hajtották végre. Tíz évvel később, 1974-ben Begley és munkatársai véglegesítették a technika nevét [25].

A CARS módszer lényege, hogy két, különböző hullámhosszú lézernyaláb egy pontba fókuszálásával állít elő az adott molekulára jellemző optikai jelet (4. ábra). CARS mikroszkópia segítségével tehát a molekulák 3D elhelyezkedéséről saját rezgési állapotaik felhasználásával kaphatunk mikroszkópiás képet [26].



4. ábra A koherens anti-Stokes Raman szórás energia diagramja: képképzés során két, különböző frekvenciájú lézer fényforrás egyszerre gerjeszti a mintát: a ω_{pump} frekvenciájú pumpa lézer és ω_{s} frekvenciájú Stokes lézer. A CARS folyamat során a mintában előáll az adott molekulára jellemző optikai jel (anti-Stokes jel), melynek frekvenciája $2\omega_{\text{as}} = 2\omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{s}}$. Gerjesztés csak abban az esetben jön létre, ha a pumpa lézer és a Stokes lézer frekvenciájának különbsége megegyezik az adott molekulára jellemző rezgési állapotra vonatkozó rezgési energiával: $\omega_{\text{vib}} = \omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{s}}$

Ez a képképző technika azért is érdekes, mert olyan anyagok is láthatóvá tehetők, amelyek fluoreszcens jelölése nem lehetséges, vagy természetes fluoreszcenciával nem rendelkeznek. CARS mikroszkópiával számos biológiai mintázat azonosítható: lipid kettős rétegek [27], zsírszövetek [28], víz [29], DNS [30], vagy az idegsejteket burkoló myelinburok [31]. A humán bőr vizsgálata során a módszer alkalmas lehet az

intracelluláris lipidek, valamint a subcutisban adipocitáinak képkalkotására, melyek fontos információként szolgálhatnak a bőr barrier funkciójáról, illetve metabolikus állapotáról.

A CARS mikroszkópia sokrétű használhatósága ellenére az *in vivo* humán vizsgálatok száma korlátozott. Elsőként König és munkatársai egészséges önkéntesek és pikkelysömörrel érintett betegek bőr szerkezetét vizsgálta *in vivo* CARS módszerrel. Fontos megjegyezni, hogy ez a vizsgálat csak a bőr epidermiszét érintette, a subcutan zsírszövet szerkezetéről *in vivo* mérések még nem elérhetők [32].

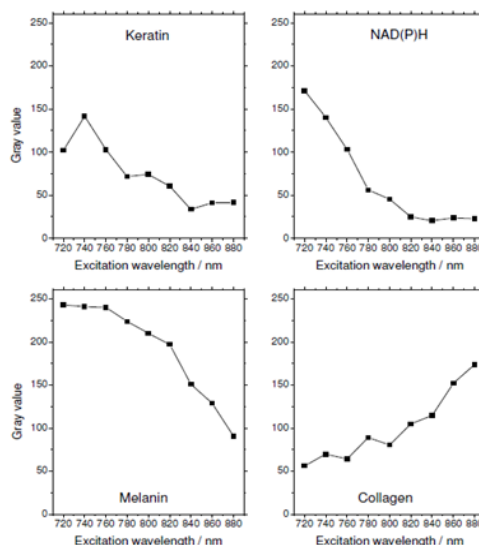
A bőrgyógyászati alkalmazások mellett szintén említésre méltó, hogy ez a képkalkoló technika igen nagy népszerűségnek örvend az idegtudományi kutatásokban is. Az idegsejteket burkoló myelinhüvely vizsgálata, a ma még gyógyíthatatlan sclerosis multiplex patofiziológiai folyamatainak feltérképezésében lehet a szakemberek segítségére [33]. CARS mikroszkópiával tehát a lipidekben gazdag myelin detektálható, mely segítségével kideríthető, milyen folyamatok vezetnek az idegsejteket támogató neuroglia sejtek pusztulásához és a myelinburok sérüléséhez [34].

1.2 A humán bőr karakterisztikája a különböző nemlineáris képkalkoló módszerek alkalmazásával

A bőrben található endogén kromofórok egyfotonos gerjesztési hullámhossza többnyire a 350-550 nm-es tartományba esik, így a kétfotonos gerjesztéshez egy közeli infravörös (700-1100 nm) tartományban hangolható lézer fényforrás szükséges [35]. A bőr endogén kromofórajának detektálása speciális optikai problémákat vet fel. Képkalkolás során figyelembe kell venni az adott alkotóelem gerjesztési és emissziós hullámhosszát, valamint az is meghatározó, hogy az azonosítandó kromofórok milyen mélységben helyezkednek el. Az eltérő gerjesztési hullámhossznak, lokalizációnak és morfológiának köszönhetően a bőr alkotóelemei egyszerűen azonosíthatók és megkülönböztethetők (5. ábra) [12].

A

Table 1. Endogenous skin chromophores.		
Chromophore	Excitation λ_{ex} (nm)	Emission λ (nm)
Fluorescence and SHG		
Retinol (20)	700–830	450
NADH (17,97–100)	340; 690–730	450–470
Vitamin D (20)	< 700	450
Flavins (17)	370, 350; 700–730	430
Melanin (101)	280–450	440, 520, 575
Elastin (101)	300–340; 700–740	420–460
Collagen		
Fluorescence	300–340; 700–740	420–460
SHG (19,101)	720–960 (tunable range of TP laser)	360–480 ($\lambda_{ex}/2$)
CARS	Excitation	Emission ω (cm^{-1})
C-H stretch	See (23,29)	2845 cm^{-1}
Sebacic glands		2845 cm^{-1}
Adipocytes		2956 cm^{-1}

B

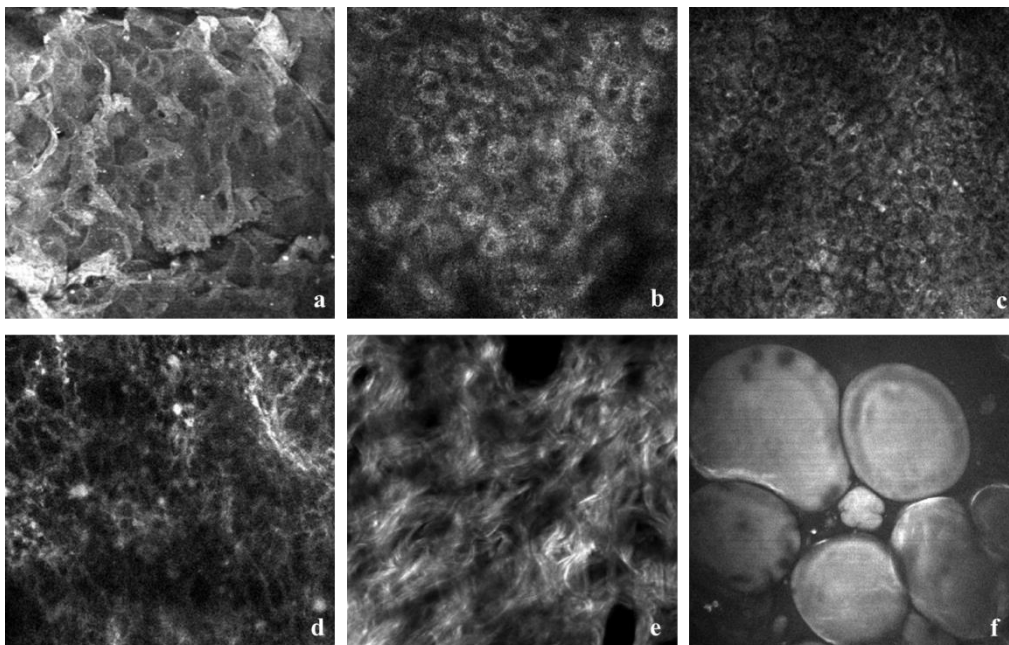
5. ábra A: Bőrben található természetes kromofórok gerjesztési és emissziós hullámhosszai [36] **B:** A bőrben található főbb kromofórok gerjesztési hullámhosszai. A keratin gerjesztési optimuma 740 nm-nél mutat maximumot. NAD(P)H esetében a hosszabb hullámhosszak felé haladva látható, hogy a jelszint csökkenő tendenciát mutat, tehát a gerjesztési optimum 720-740 nm között van. Bőrünk festékanyaga fényszűrő (abszorbeáló és fényszóró) tulajdonsági révén széles spektrumban gerjeszthető, ami képalkotás közben erős háttérrel adhat és más kromofór gerjesztési hullámhosszaival is átfedhet, de hosszabb hullámhosszak felé haladva a jelszint csökken. Kollagén esetében a másodharmonikus keltés az infravörös hullámhossz tartományba hangolt lézer fényforrással indukálható (>800 nm) [12].

A bőr legkülső rétegét alkotó stratum corneum fő kromofórja a keratin, ami a kétfoton gerjesztéssel detektálható. A keratin jellemzően a nagyméretű, lapos, hatszög alakú szarusejtekben található, és gerjesztési optimuma az alacsonyabb 720-740 nm-es hullámhossz tartományba esik (6. ábra/A).

Az epidermisz sejtjei hasonló gerjesztési hullámhosszak mellett detektálhatók, itt azonban a mitokondriumban található NADH és NAD(P)H a fő kromofór, így a citoplazma ad jelet, míg a sejtmagok sötét pontként jelennek meg képalkotás során. Körülbelül 20 μm mélységben detektálhatók a stratum granulosum sejtjei, melyek ovális alakúak és nagy sejtközzötti térrel rendelkeznek (6. ábra/B). A mélyebb rétegekben, mint a stratum spinosum és a stratum basale, a sejtek már kisebb méretűek, szögletes alakúak, sűrűbben helyezkednek el és szorosan illeszkednek (6. ábra/C). Az epidermisz sejtjeinek e tulajdonságai fontos információként szolgálhatnak különböző tumorok, gyulladásos megbetegedések diagnosztikájában, valamint *in vivo* farmakológiai vizsgálatokban.

A kötőszövetet alkotó rostok és amorf komponensek struktúrája biztosítja a bőr konzisztenciáját, anyagcseréjét, keringését, beidegzését és a bőr sérüléseinek

korrekcióját. Továbbá különböző gyulladásos folyamatok, tumoros inváziók és metastasisok helyszínéül szolgál, így a dermisz összehangolt, szerteágazó működésének vizsgálata közkedvelt kutatási téma napjainkban. A dermiszben található elasztin (6. ábra/D) és kollagén (6. ábra/E) bőrünk kötőszövetét alkotó struktúrproteinek, melyek a kétfoton gerjesztéssel (700-740 nm) és az SHG módszerrel (> 800 nm) detektálhatók. Mint látható a két fehérje igen eltérő optikai tulajdonságokkal rendelkezik, így azok egyszerűen elkülöníthetők egymástól, ezáltal a dermisz struktúrájáról rendkívül részletgazdag felvételek készíthetők, melyek segítségünkre lehetnek a bőr öregedési folyamatainak vizsgálatában, ugyanakkor a tumoros elváltozások jellemzésében is.



6. ábra *Ex vivo* humán bőr keresztmetszete a különböző nemlineáris optikai módszerek alkalmazásával, saját felvételek alapján [37]. A: keratin – TPEF, B: stratum granulosum sejtei - TPEF, C: stratum basale sejtei – TPEF, D: elasztin – TPEF, E: kollagén – SHG, F: adipocita - CARS

A zsírszövetben gazdag subcutis bőrünk rögzítését és rugalmasságát biztosítja. A CH_2 kötésekben gazdag lipidek CARS módszer segítségével jelölés nélkül azonosíthatók. A subcutan zsírsejtek jellemzően 50-100 μm átmérőjű ovális vagy gömbölyded alakúak, és szinte teljes térfogatukat egyetlen zsírcsepp tölti ki, ezáltal minden más sejtalkotó a sejt szélére lokalizálódik (7. ábra/F). Ezek ismeretében nem meglepő, hogy a CARS mikroszkópiás felvételeken az adipocitákban található zsírcseppet detektáljuk. A zsírsejtek mellett egyéb lipid-tartalmú alkotóelemek is

azonosíthatók a bőrben, mint például a sejtmembránok lipid- kettősrétege vagy a faggyúmirigyek.

1.3 Nemlineáris mikroszkópai módszerek alkalmazási lehetőségei a dermatológiában

1.3.1 Az epidermisz endogén kromofórai és vizsgálati lehetőségei

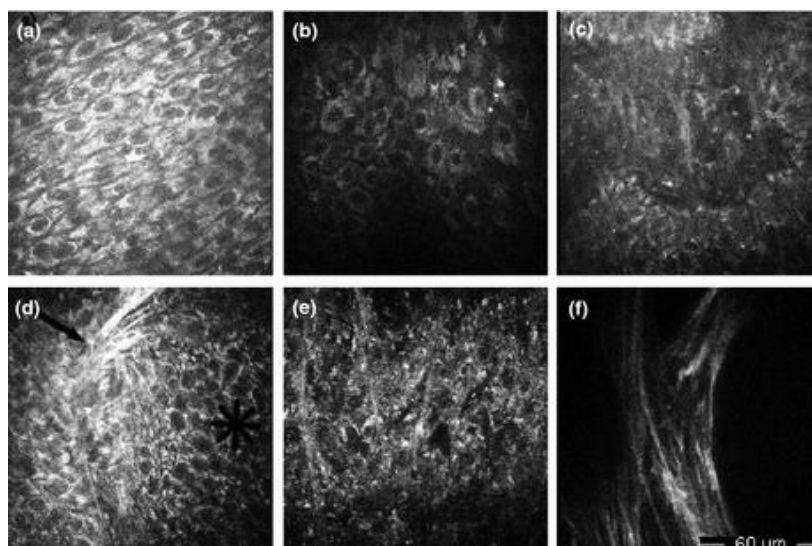
A bőr legkülső rétegét alkotó stratum corneumot mag nélküli, elhalt, lapos szarusejtek alkotják. A külső szaruréteg igen ellenálló a fizikai és kémiai behatásokkal szemben, és a bőr savköpenyével, lipiddköpenyével, valamint a mikroflórával együtt alkotják a legkülső védőzónát, a bőr barrierjét. A stratum corneum szerkezetének szemléltetésére a „tégla és malter” modellt használják általánosságban. A bőr védőfalához a „téglát” a stratum granulosum keratinocitái és a stratum corneum corneocitái adják, még a bőr felszíni és intercelluláris lipid rétege képezi a „maltert”. A stratum corneumban a lipideket többnyire ceramidok és a keratinociták lamelláris testecskeiből felszabaduló lipidek adják, melyek feladata a szaruréteg stabilizálása és a transepidermális vízvesztés megakadályozása. A barrier károsodásának gyakori tünetei a hámló, irritált, viszkető bőr – ezek hátterében általában a szaru- és lipidtermelés elégtelen működése állhat. Továbbá a transepidermális vízvesztés fokozódik, ez *circulus vitiosusként* tovább ronthatja a bőr gyulladását, viszketését valamint hámlását. További probléma lehet, hogy gyengül a mechanikai behatásokkal szembeni ellenálló képesség, és gyengül az immunológiai védekezés is [38].

A bőr barrier funkciójának vizsgálatára manapság a legelterjedtebb módszer a Courage + Khazaka cég által gyártott TEWAmeter TM300 használata, mely a bőr transepidermális vízvesztésének mérésére alkalmas eszköz. A készülék egy nyitott kamrában határozza meg a bőrből elpárolgó víz mennyiségét két szenzor segítségével, melyek a hőmérsékletet és a relatív páratartalmat mérik (g/h/m^2). Barrier defektus esetén az elpárolgott víz mennyisége megnövekedett [39].

A bőr barrier funkciójának vizsgálata a különböző nemlineáris képalkotó technikák segítségével is megvalósítható. Alapvetően két módszer alkalmazásával vizsgálódhatunk: 1. közvetlen az epidermális intracelluláris lipideket tesszük láthatóvá

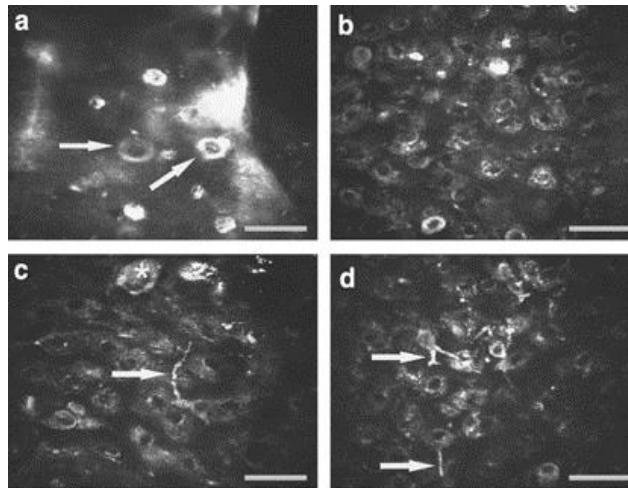
in vivo CARS módszerrel, és ezek mennyisége alapján következtethetünk a lipidköpeny állapotára [40, 41], vagy 2. különböző anyagok *in vivo* penetrációjának sebességét követhetjük nyomon, mely felvilágosítást adhat a védőréteg intaktságáról [42]. Az *in vivo* penetrációs vizsgálatok továbbá nem csak a barrier állapotáról szolgáltathatnak értékes információkat, hanem különböző hatóanyagok bőrbe jutását is egyszerűen nyomon követhetjük, mely a farmakológiai és kozmetológiai kutatásokban egy kulcsfontosságú paraméter [43-45].

A bőr alkotóelemeinek karakterisztikája fontos diagnosztikai marker lehet különböző dermatológiai kórképek azonosításában. Az epidermisz sejteinek alakja, nagysága, irányultsága és rendezettsége fontos információként szolgálhat a különböző daganatok vagy gyulladásos megbetegedések diagnosztizálásában, illetve *in vivo* farmakológiai vizsgálatokban [46, 47]. Az utóbbi években számos publikáció foglalkozott a melanoma és a nem-pigmentált malignus bőrtumorok kétfoton mikroszkópiás vizsgálatával [48-50]. A basalioma kétfoton karakterisztikájára jellemző, hogy a tumorsejtek nagy sejtmaggal és kevés citoplazmával rendelkeznek, kerítéslécszerű ún. paliszád elrendeződésűek. A tumorban a hámsejtek szabálytalan alakúakká válnak és random módon rendeződnek el, a dermiszben pedig erős autofluoreszcenciát mutató daganatos sejtfészkek láthatók, továbbá a kollagén szerkezet károsodott a tumor területén (7. ábra) [51].



7. ábra Bazálsejtes karcinóma keresztmetszeti képe Seidenari és mtsai (2013) alapján: A; szorosan illeszkedő, megnyúlt sejtek egy irányban $z = 50 \mu\text{m}$, $\lambda_{\text{ex}} = 760\text{nm}$, B; tumoros sejtek, két irányban illeszkedve $z = 50 \mu\text{m}$, $\lambda_{\text{ex}} = 760\text{nm}$, C; basaliomára jellemző paliszád állású sejtek $z = 80 \mu\text{m}$, $\lambda_{\text{ex}} = 760\text{nm}$, D; sejtcsoportok a kötőszöveti rostba ágyazva $z = 90 \mu\text{m}$, $\lambda_{\text{ex}} = 760\text{nm}$, E; tumor sejtek és kötőszöveti rostok keveredve $z = 30 \mu\text{m}$, $\lambda_{\text{ex}} = 760\text{nm}$, F; károsodott extracelluláris mátrix fehérjék a tumor területén (phantom islands) $z = 75 \mu\text{m}$, $\lambda_{\text{ex}} = 800\text{nm}$ (λ_{ex} = gerjesztő hullámhossz, z = mélység)

Melanómák kétfoton mikorszkópiás klinikai vizsgálata során Dimotrow és munkatársai a következő hat morfológiai kritériumot határozták meg: 1; melanocita infiltráció figyelhető meg a felső epidermális rétegekben 2; jelentős a sejtek közötti távolság 3; a sejtek pleomorf, szabálytalan alakúak 4; sejtfragmentek jelennek meg a stratum spinosumban 5; a keratinocita sejthatárok rosszul definiáltak 6; dentritikus sejtek azonosíthatók (8. ábra) [52].



8. ábra *Ex vivo* melanoma malignum keresztmetszeti képe Dimitrow és mtsai (2009) alapján. a; erős autofluoreszcenciát mutató melanociták (nyíl) figyelhetők meg a stratum corneumban és a felsőbb epidermális rétegekben. b, c, d; stratum granulosum (b) és stratum spinosum (c, d) területére nagy sejt közötti távolságok, elmosódott sejthatárok és rendezetlenség jellemző. A stratum spinosum rétegében sejtfragmentek és dentritikus sejtek azonosíthatók (nyilak).

A bőrtumorok non-invazív vizsgálata műtétek tervezésénél is segíthet a pontos tumor határok feltérképezésében, valamint gyógyulási folyamatok és az esetleges recidíva képződés követésében. Fontos megjegyezni, hogy napjainkban a nemlineáris mikorszkópia a melanoma és nem pigmentált bőrtumorok diagnosztikájában egyelőre, mint kiegészítő vizsgálat szerepel, továbbra is a szövettani mintavétel számít „arany standard”-nak.

1.3.2 A dermisz endogén kromofórai és vizsgálati lehetőségei

A kötőszövetet alkotó kollagén szerkezete a bőr öregedési folyamatainak, kozmetológiai hatóanyagok hatásosságának, valamint a tumor invázió mértékének megítélésében fontos paraméter. A kollagén jelölés nélküli képalkotása az SHG

módszerrel lehetséges, tipikusan 800 nm feletti gerjesztési hullámhosszak alkalmazásával [12].

Az öregedő bőr jellemzően száraz, fakó, sérülékeny, melyek a bőrfunkciók csökkenésének és az általános sorvadás következménye. A legszembeütőbb eltérések a bőr vonalas gyűrődései, a ráncok. Ezek egyik típusa, melyek az izommozgások következtében alakulnak ki, dinamikus ráncoknak nevezünk, majd ezek állandósulnak, és statikus ráncokká válnak. A ráncok vizsgálata és osztályozása a bőr öregedésének megítélésében fontos paraméter. Manapság a sok szubjektív elemet is tartalmazó osztályozási rendszerek (Glogau, Fitzpatrick) mellett az objektív vizsgálatok kerültek előtérbe, mint például a különböző számítógépes kép analízisek, illetve az *in vivo* optikai képalkotó módszerek [53-55]. Az első olyan publikáció, mely kellő részletességgel vizsgálja az idősödő bőr szerkezetét *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával Koehler és munkatársai nevéhez köthető. 18 különböző életkorú és nemű önkéntes alkarjának hajlító felszínén végeztek méréseket [56]. *In vivo* SHG módszerrel a dermális kollagént, míg TPEF technikával az elasztint detektálták. A digitális képek kiértékelése során először a morfológiai jellemzőket definiálták, majd ezeket különböző paraméterek szerint kategorizálták, mint például rost morfológia, mintázat, kiterjedés vagy az elasztózis mértéke, amorf komponensek lerakódásai. A vizsgálat során definiált morfológiai jellemzők összhangban voltak a rutin szövettani metszeteken azonosított elváltozásokkal.

A bőr öregedési folyamatait nemcsak az elhízás, UV sugárzás vagy a dohányzás gyorsíthatja fel, hanem az ún. glikációs folyamatok is [57]. Nem-enzimatis glikációnak nevezzük azt a több lépésben zajló, egy idő után irreverzibilissé váló folyamatot, mely redukáló cukrok (glükóz, fruktóz, ribóz) és fehérjék aminocsoportja között játszódik le. A glikáció során ún. előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation endproducts = AGE) keletkeznek, melyek a hosszú élettartamú fehérjéken akkumulálódnak. Az AGE akkumulációjának fontos szerepet tulajdonítanak a krónikus veseelégtelenség és a cukorbetegség késői szövődményeinek kialakulásában, valamint az Alzheimer kór patogenezisében és az öregedési folyamatokban is [58-60].

A glikációs folyamatok elsősorban a bőr extracelluláris mátrix fehérjéit veszélyeztetik. Fiziológiás körülmények között a kollagén rostok kovalens kötással kapcsolódnak egymáshoz, ezzel biztosítva bőrünk rugalmasságát. A glikáció során

olyan nem-enzimatisz merev keresztktések jennek létre, mely a kollagén rostok összetapadását okozzák, így azok elvesztik rugalmasságukat. Továbbá a szabadgyök képződés is jelentős, ez a gyulladásos folyamatok kialakulásának kedvez. Egyes AGE-termékek jellegzetes fluoreszcens tulajdonságot mutatnak 350 és 390 nm közötti excitációs, illetve 440 és 490 nm közötti emissziós maximummal [61]. Meerwald és munkatársai 2004-ben létrehoztak egy olyan készüléket (AGE Reader, DiagnOptics, Groningen, Hollandia), amely alkalmas a bőr autofluoreszcenciájának mérésére *in vivo* (9. ábra) [62].



9. ábra A bőr autofluoreszcenciájának *in vivo* mérése AGE Readerrel (DiagnOptics, Groningen, Hollandia). A készülék egy 2x2 cm-es területen világítja meg a bőrt 300-420 nm hullámhosszú fényvel, jellemzően 370 nm gerjesztési maximummal, ami a bőrben található glikált végtermékeket gerjeszti. Az emittált fényt egy spektrométer méri, 300-600 nm-es tartományban, így a bőrben található glikált végtermékek mennyisége meghatározható. A bőr autofluoreszcenciája összefüggést mutat a diabétesz szövödményeinek súlyosságával. Kép forrása: <http://www.diagnoptics.com/age-reader/>

A bőr autofluoreszcencia értékei korreláltak a diabéteszszel összefüggő komplikációk súlyosságával. A technika azonban nem terjedt el széles körben, ugyanis a módszernek hátrányai is vannak. Az autofluoreszcenciával nem rendelkező AGE-k mérése nem lehetséges ezzel a készülékkel, továbbá a bőrben található egyéb kromofórok, melyek hasonló gerjesztési hullámhosszal rendelkeznek, a mérés szelektivitását csökkentik és félrevezető eredményt adhatnak [63].

Az SHG módszer a dermális kollagén *in vivo* képalkotására alkalmas, így segítségével a glikációs folyamatok mértéke nyomon követhető. A bőr glikációját kísérletes körülmények között egyszerűen előidézhethetjük: taiwani kutatók szarvasmarha bőrt 0,5 M ribóz oldatban inkubáltak, ezzel modellezve a hiperglikémiás körülményeket. A kollagén glikációját SHG módszerrel, míg az elasztin morfológiai változásait a TPEF technikával követték nyomon a 2. 4. 6. 8. és 10. napon.

Eredményeik azt mutatták, hogy a kollagén glikációja az SHG jel csökkenését okozta, elasztin glikáció esetében pedig az autofluoreszcens jel intenzitása szignifikánsan növekedett. Munkájukkal továbbá azt is bizonyították, hogy a nemlineáris képalkotó módszerek alkalmasak a glikáció okozta kötőszöveti fehérjék szerkezeti változásainak nyomon követésére [64, 65].

A dermális kollagén szerkezete a bőr öregedési folyamatainak vizsgálata mellett, a tumor inváziók és metasztázisok azonosításában is jelentős szerepet játszhat. Melanomák és nem pigmentált bőrtumorok egyik fontos jellemzője a nagyfokú inváziókészség, mely a környező kötőszövetet destruálja. A tumorsejtek penetrációja a bazális membránon keresztül a metasztázis képzés komplex folyamatának kiinduló lépése. Továbbá a bőrtumorok közös jellemzője a kötőszöveti kollagén degradációja a MMP enzimsalád aktiválásán keresztül, a tumorhatárok mentén. Ezek a folyamatok az SHG módszer alkalmazásával megfelelően demonstrálhatók. 2008-ban Thrasivoulou és munkatársai, vizsgálták a melanoma tumorhatárok kiterjedését SHG mikroszkópiával [66]. Munkájuk során 8 darab három különböző szövettani altípusba tartozó melanoma rutin szövettani metszeteit – hematoxylin-eozin és melan-A festés – hasonlították össze a natív metszetek SHG felvételeivel. Eredményeik azt mutatták, hogy a tumor területén a kollagén szerkezete csaknem teljes mértékben degradálódik, ezáltal az SHG jel az ép területekhez képest sokkal alacsonyabb, vagy nem mérhető. Így kollagén jelenléte vagy hiánya a tumor szélső határainak definiálásában egy fontos paraméter, és ezek az eredmények korreláltak a rutin szövettani metszeteken meghatározott tumor szélekkel. Melanomák és nem pigmentált bőrtumorok *in vivo* kétfoton mikroszkópiás vizsgálata jelenleg a főbb szövettani jellemzők azonosítására alkalmas, valamint a kollagén degradációja is detektálható a tumor területén, de a tumorhatárok pontos definiálása a képalkotó technikák további pontosítását igényli.

1.3.3 A szubkutisz vizsgálati lehetőségei

A zsírszövet legfontosabb szerepe szervezetünk egészére nézve, az energiaraktározás, védelem a fizikai hatásokkal szemben, valamint egyes szervek kipárnázása. Az utóbbi 20 év kutatási eredményei azonban megváltoztatták a zsírszövet funkcióiról alkotott nézeteket [67].

Ma már ismert, hogy a zsírsejtek szervezetünk számos alapvető élettani folyamatának kulcsszereplői. Endokrin funkciót látnak el, részt vesznek gyulladásos folyamatokban, valamint a karcinogenezisben [68]. A zsírszövetet érintő betegségek közül világszerte a táplálkozási zavarok – mint például az elhízás vagy az alultápláltság – a leggyakoribbak. Elhízás során a túlzott zsírraktározás olyan mértékű, hogy az káros lehet az egészségre és számos krónikus betegség kialakulásához vezethet, ilyen például a magas vérnyomás, szív- és érrendszeri megbetegedések vagy a 2. típusú diabétesz, de különböző daganatos megbetegedések hátterében is a kóros elhízás állhat. Az obezitás világviszonylatban az elsőszámú megelőzhető halálozási ok, felnőtteknél és gyermekeknél egyaránt növekvő arányban jelentkezik, és az egészségügyi hatóságok megítélése szerint a 21. század egyik súlyosabb közegészségügyi problémájaként tekinthető [69]. Az elhízás okai mindenki számára jól ismertek: túlzásba vitt táplálkozás, mozgásszegény életmód, genetikai hajlam. Egyes esetekben azonban genetikai okok, központi idegrendszeri vagy az endokrin rendszer zavara állhat a háttérben, ugyanakkor egyes gyógyszerek vagy pszichiátriai megbetegedések is elhízást okozhatnak. A zsírsejtek által termelt bioaktív anyagokat adipokineknek nevezzük. Az elhízás során megváltozott adipokin termelés fokozza az elhízással összefüggő 2. típusú diabétesz, valamint a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát [70].

Az adipokinek közül a leptin felfedezése adott új lendületet az elhízás genetikai hátterének kutatásával kapcsolatos vizsgálatoknak [71]. A leptin zsírsejtek által termelt hormon, mely az éhség és jóllakottság szabályozásában központi szerepet játszik, hatását a hipotalamuszban lévő leptin receptorokon keresztül fejti ki. Leptin deficiencia esetén a hormon hiánya evéskényszerszerűen okoz, így már kisgyermek korban extrém fokú elhízáshoz vezet. Ezekben az esetekben azonban a terápiásan adott leptin sikeres fogyáshoz vezet. Az elhízásnak ez a formája nagyon ritka. Az obezitással küzdő

egyénknél leptin rezisztencia alakul ki, így a keringésben nagyon magas leptin szint mérhető, ezért a hormon beadása hatástalan [72].

Az elhízás számos szindróma fő tünete is lehet, ilyen például a Prader-Willi, Angelman vagy a Bardet-Biedl szindróma. Mind a leptin deficienciát, mind a szindrómás elhízást okozó genetikai eltérések súlyos következményekkel járnak, de előfordulásuk igen ritka. Sokkal gyakoribb a poligénes elhízás, melyet genetikai tényezők és környezeti hatások együtt okozhatnak. Manapság viszont az az elfogadott nézet, hogy a gének vagy a gének egy bizonyos variánsai nem tehetők felelőssé az elhízás ilyen rövid idő alatt bekövetkezett elterjedéséért. A túlzott energia bevitel, fizikai inaktivitás, vagy a megváltozott étkezési szokások tehetők leginkább felelőssé az elhízás „epidémiájáért” [73].

A 2. típusú cukorbetegség gyakorisága világszerte növekszik, jelenleg hazánkban a lakosság mintegy 6 %-át érinti, a metabolikus szindróma előfordulási gyakoriságát egy 2000-ben végzett reprezentatív felmérés alapján pedig 7,6%-osnak határozták meg [74, 75]. A betegek számát az ezredfordulón világszerte 175 millióra becsülték, míg az újabb előrevetített adatok szerint a kórkép 2030-ra 370 millió embert fog érinteni [76]. A diabétesszel járó keringési és érrendszeri megbetegedések mellett a bőrgyógyászati kórképek kialakulásának esélye is megnövekedett, melyek jelentőséggel bírnak a mindennapi klinikai gyakorlatban. Mai napig súlyos problémát okoz a diabétesszel járó fekélyek terápiája, melyek a talpi lokalizáció miatt nehezen észrevehetőek, könnyen felülfertőződhetnek, és rendkívül nehezen gyógyulnak [77].

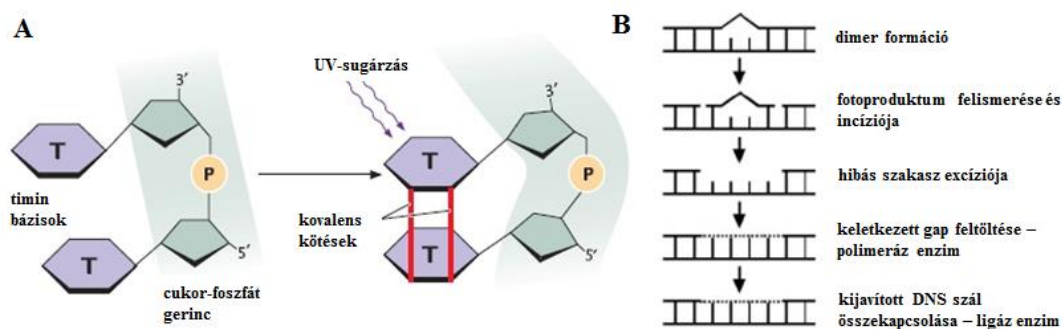
Elhízás során a megnagyobbodott zsírszövetek által termelt szabad zsírsavak és egyéb citokinek a kötőszöveti struktúrproteinek degradációját okozzák [78, 79]. Az SHG módszere, *in vivo*, jelölés nélküli képalkotást tesz lehetővé, ezáltal szövettani mintavétel nélkül tájékozódhatunk a kötőszövet állapotáról. A technika segítségével a dermális kollagén degradációja már korai stádiumban, a szemmel látható elváltozások kialakulása előtt azonosítható.

A megnagyobbodott zsírszövetek képalkotása a CARS módszerrel lehetséges, igaz jelenleg még csak *ex vivo* mintákon. *In vivo* körülmények között a bőr barrier funkciója vizsgálható. Az intracelluláris lipidek detektálása a csökkent barrier funkció visszaállítására szolgáló kezelések hatékonyságának követésében válhat objektív módszerré.

1.4 A nemlineáris mikroszkópai módszerek biztonságtechnikája

Az *in vivo* humán vizsgálatok elvégzéséhez elengedhetetlen a nemlineáris képképző folyamatok biztonságtechnikai kockázatának felmérése, megítélése. A képképzőhöz szükséges nagy csúcsintenzitású, lézer fényforrás nem megfelelő beállítások mellett károsíthatja a vizsgált mintát, ami lehet hő- és/vagy fotokémiai károsító hatás [80, 81].

A fotokémiai károsodás az intracelluláris kromoförök kétfotonos gerjesztésének következtében alakulhat ki. Sejtes rendszerekben ez a károsodás teljesen hasonló az UV besugárzás által okozottal [82, 83]. A DNS abszorpciós spektruma 245-290 nm (260 nm-es maximummal) nagyjából a napfény UVC és UVB tartományát foglalja magába. Az UV-fotonok a DNS-ben elnyelődve ciklobután-pirimidin-dimereket (CPD) és pirimidin-(6-4)-pirimidon (6-4)-PD) fotoproduktumokat indukálnak. Az UV által okozott DNS károsodások 75%-ban CPD-k kialakulásához vezetnek (10. ábra/A). Az említett DNS-léziók a nukleotid excíziós reparáció (NER) révén javíthatóak ki (10. ábra/B), azonban nem megfelelő reparáció esetén, a tovább folyó replikáció hatására DNS-hurkok, majd egyszálú DNS-gap-ek keletkeznek a dimerek helyén, ami a DNS kettős hélix torzulásához és a polimeráció blokkolásához vezethet [84].



10. ábra A: a ciklobután pirimidin dimerek képződésének folyamata: UV fény hatására a DNS szomszédos pirimidin bázisai között kovalens keresztkötések jönnek létre. Ezek leginkább timin-timin (TT) dimerek, de lehetnek timin-citozin (TC), citozin-timin (CT), legritkábban citozin-citozin (CC) dimerek is. Ezeket a keresztkötéseket a nukleotid excíziós reparációs rendszer képes felismerni és kijavítani. **B:** A többlépcsős enzimatikus folyamat főbb lépései a következők: a hibás DNS szakasz felismerése, DNS molekula incíziója, majd a hibás szakasz eltávolítása (excízió), a keletkezett „hézagot” (gap) a polimeráz enzim feltölti, végül a kijavított szálakat a ligáz enzim kapcsolja össze. Elégtelen reparáció esetén DNS-hurkok, majd egyszálú DNS-gap-ek keletkezhetnek a dimerek helyén, ami a DNS kettős hélix torzulásához és a polimeráció blokkolásához vezethet.

Jelenleg az irodalomban számos olyan tanulmány található, melyben a különböző lézer fényforrások DNS-károsító hatásait vizsgálták *in vitro* sejttenyészeteken, melyek megfelelő modellként szolgáltak a léziók pontos azonosításához, mivel a lézernyaláb által pásztázott területek egyszerűen visszakereshetők [85-89].

A humán biztonságtechnikai vizsgálatok száma ezekkel ellentétben igen korlátozott. Fischer és munkatársai frissen kivágott *ex vivo* humán nyaki és gluteális régióból vett mintákat sugaraztak be Solar Simulator készülékkel (uv-med), valamint különböző hullámhosszra és teljesítményre állított femtoszekundumos lézerrel [90]. Ezután a mintákat paraffinba ágyazták, majd a metszeteken immunfluoreszcens jelöléssel azonosították a CPD-ket. Eredményeik azt mutatták, hogy 760 nm hullámhossz és 60 mW teljesítmény mellett, az epidermisz sejtjeiben már egyértelműen detektálhatók a DNS-károsodások, valamint ez a teljesítmény körülbelül 1,5 MED-nyi UVB sugárzásnak felel meg. A cikkben publikált eredményekkel szemben azonban több kritika is megfogalmazható: 1. a nyaki bőr általában napnak kitett terület, ennek következtében a be nem sugarazott minta is határozott CPD pozitivitást mutatott, így a lézer által okozott esetleges károsodások elkülönítése nem lehetséges, 2. munkánk során hasonló kísérleteket végeztünk, azonban a fent említett beállításokkal több alkalommal is negatív eredményt kaptunk, 3. a szerzők ugyanezt a publikációt egy másik folyóiratban is megjelentették, azonban ott 800 nm-es hullámhosszú lézer fényforrást alkalmaztak, de ugyanezeket az eredményeket közölték [81, 90]. A 800 nm-es hullámhossznak kisebb a biztonságtechnikai kockázata, hiszen a 760 nm-hez képest távolabb esik a DNS háromfotonos gerjesztési optimumához.

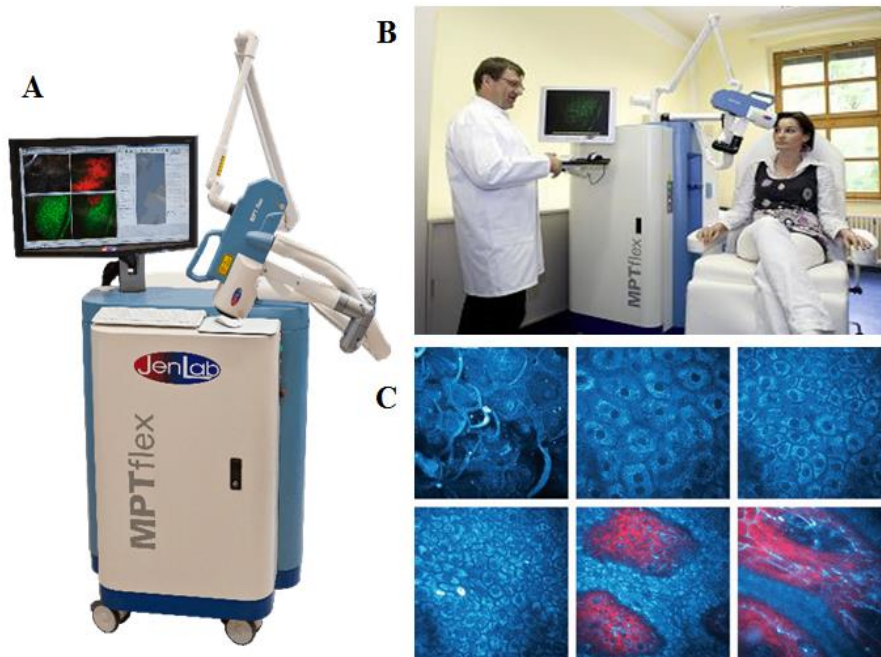
A fototoxikus károsító folyamatok mellett a termikus károsodás lehetőségét is szem előtt kell tartani, hiszen az alkalmazott, hosszabb hullámhosszú infravörös fény egyfotonos abszorpciója jelentős hőmérséklet emelkedést okozhat a vizsgált mintában, mely károsíthatja a fehérjéket vagy a DNS-t. Masters és munkatársai *ex vivo* humán bőrmintán vizsgálták az esetleges termikus károsodásokat [91]. Érdekesség, hogy korábban Denk és Webb, a kétfoton mikroszkópia úttörői nem tulajdonítottak jelentőséget a hőkárosító hatásoknak. Mastersék azonban, ennek ellentmondva megfigyelték, hogy a bőrben található melanin egyfotonos abszorpciója következtében léphet fel termikus károsodás. Részletesebben, a melanin egyfoton abszorpciója hőmérséklet emelkedést okoz, mely következtében a melanin elpárolog – ezt a

folyamatot kavitációnak nevezzük – ez pedig morfológiai változást okoz a vizsgált mintában, így a károsodott területek azonosíthatók. Különböző lézer paraméterek, mint például teljesítmény vagy ismétlési frekvencia megfelelő alkalmazásával a termikus károsodások kialakulásának esélye minimalizálható.

Összefoglalva, a nemlineáris képalkotó módszerek számos előnyük ellenére biztonságtechnikai problémákat vethetnek fel. A technikával szemben alapvető követelmény, hogy a lézer fényforrás ne okozzon károsodást a bőrben. Ehhez elengedhetetlen a fotokémiai és termikus károsodások által okozott léziók azonosítása, és a megfelelő lézer paraméterek optimalizálása, mely következtében a nemlineáris képalkotó módszerek biztonságossá válnak, és alkalmasak a bőr *in vivo* vizsgálatára.

1.5 Kereskedelmi forgalomban kapható klinikai berendezések

Jelenleg piacon lévő, bőr *in vivo* multifoton mikroszkópiás vizsgálatát lehetővé tevő egyetlen klinikai készülék a DermaInspect (11. ábra) (JenLab GmbH, Jena, Németország) (<http://www.jenlab.de/MPTflex-R.114.0.html>). A készülék fényforrása hagyományosan szilárd-test lézer alapú, ezáltal nagy helyigényű és igen költséges, ára körülbelül 100 millió Ft, így csak néhány vezető kutatóintézet – mint például a L’Oreal – rendelkezik ilyen berendezéssel, magyarországi viszonylatban szinte megfizethetetlen. A nagyméretű vizsgálófej megnehezíti a gerjesztő lézernyaláb bőrmintára juttatását, illetve a keltett optikai jel detektálása is nehézkes, mivel a fény egy bonyolult tükrörendszeren keresztül jut el a mintáig.



11. ábra A,B: Multifoton mikroszkópiás elven működő klinikai készülék a DermaInspect felépítése és használata. **C:** A bőr *in vivo* keresztmetszete DermaInspect berendezéssel. Balról jobbra haladva láthatjuk a stratum corneumot alkotó keratint, a stratum granulosum, stratum spinosum és a stratum basale sejtjeit, majd a dermális papilla rétegében megjelenik a kötőszövetet alkotó kollagén is [19].

A hátrányok ellenére azonban számos tanulmány jelent meg, melyben ezt a készüléket használják. Segítségével lehetséges például a melanomák azonosítása, megkülönböztetése naevusoktól, basaliomák diagnosztizálása és típusainak meghatározása, bőr öregedésének vizsgálata, illetve különböző hatóanyagok, nanopartikulumok penetrációjának követése [17, 19, 50, 51].

A DermaInspect berendezés nagy mérete és magas költsége miatt joggal merül fel az igény a kisméretű, kézben tartható nemlineáris mikroszkópok iránt. Jelenleg csak pár ilyen készülék ismert, azok is inkább demonstrációs céllal készültek, állatkísérletekben és alapkutatási munkák kivitelezésében lehet a szakemberek segítségére [92, 93].

2. Célkitűzések

Munkánk során különböző nemlineáris képalkotó módszerek alkalmazási lehetőségeit vizsgáltuk a dermatológiában, illetve felmértük a képalkotásra használt lézerek potenciális biztonságtechnikai kockázatait. Klinikánk 2009 óta több neves hazai kutatócsoporttal együtt végez fejlesztéseket, melynek célja egy kisméretű, kompakt, kevésbé költséges, de teljes értékű lézerpasztázó mikroszkóp megtervezése, mely a bőrgyógyászok munkáját segítheti a mindennapi klinikai gyakorlatban. Kísérleteink többségét még egy hagyományos Carl Zeiss gyártmányú kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal (LSM 7MP) végeztük, azonban mérési eredményeink az imént felvázolt és megvalósítani kívánt képalkotó eszköz (*FiberScope*) tervezéséhez és megépítéséhez szükséges alapadatokat szolgáltatottak. Méréseink során olyan jelenségeket vizsgáltunk, melyek biokémiai, molekuláris biológiai hátterét, illetve szövettani jellemzőit már jól ismerjük, de *in vivo* képalkotó módszerekkel még nem vizsgálták kellő részletességgel. Ilyenek például különböző nanomedicinák penetrációjának követése a bőrben, vagy az elhízás okozta kötőszöveti rostok átépülése, degradációja, a szubkután zsírsejtek megnagyobbodásának detektálása, vagy az általunk használt lézer fényforrások esetleges DNS károsító hatásainak vizsgálata. Ezek az alapvető és egyszerűen követhető folyamatok a jövőben hasznos információként szolgálhatnak farmakológiai vizsgálatokban illetve számos dermatológiai kórkép diagnosztikájában.

2.1 Nanomedicinák bőrön történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

A bőr védelmi rendszere kitüntetett szerepet játszik a szervezet integritásának szempontjából, ma már kiemelten fontos – számos elemében önálló – immunológiai szervnek tekintik. A Langerhans sejtek az epidermiszben előforduló csontvelő-eredetű dendritikus sejtek, melyek bőrünkben antigén prezentáló feladatot látnak el. Mobilis sejtek, ami azt jelenti, hogy immunológiai feladatuk teljesítése során a nyirokutakon át a regionális nyirokcsomókba vándorolnak, ahol az a feladatuk, hogy az antigéneket bemutatássák a T-sejteknek [38]. Utóbbi ismeretek vezettek a transzcután immunizáció

technikájának kidolgozásához. A módszer lényege a következő: a szervezet immunizációját egy adott antigénnel szemben úgy hozzuk létre, hogy az antigéneket az epidermiszen keresztül, topikálisan alkalmazzuk, majd ezt követően eljuttatjuk a célsejtekhez, amelyek az antigén prezentáció során megvalósítják a szervezet immunizációját. A különböző vakcinák szervezetbe juttatásánál a transzcután immunizáció egy fontos, új technikává válhat a közeljövőben [94]. A stratum corneumot alkotó komplex lipid-protein struktúra azonban a különböző gyógyszerkészítmények bőrön keresztül történő bejutását gátolhatja. Az antigén stratum corneumon keresztüli penetrációjához lipofil tulajdonsággal kell rendelkeznie és mérete nem haladhatja meg az 500 kDa-t [95]. E probléma áthidalására ma már számos módszer került kidolgozásra, mint például az iontoforézis [96], elektroporáció [97], mikro/nanotűk használata [98] vagy az ultrahang technika [99], az antigén stabilitására azonban ezek az eljárások negatív hatással lehetnek.

Jelen munkánkban a velünk kollaboráló munkacsoport által használt DermaVir nanorészecskék penetrációját vizsgáltunk *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával. A festékjelölt DermaVir részecskékben az Alexa546 festék egy kovalens kötésen keresztül kötődik egy polietilénimin-mannóz (PEIm) nanorészecskéhez, ami a bejuttatni kívánt plazmid DNS-t tartalmazza. A nanopartikulumok penetrációját és felvételüket az immunsejtek által Langerin-EGFP *knock in* egereken vizsgáltuk *in vivo* mérési körülmények között. Egy korábbi közleményben a nanopartikulumok és a Langerhans sejtek kolokalizációját már sikeresen detektálták hagyományos Zeiss kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal [47]. A dolgozatban bemutatott munkánk során szintén ezt a jelenséget vizsgáltuk, ezúttal *in vivo* CARS módszerrel, és kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával *FiberScope* készülékünkkel.

2.2 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken

A metabolikus szindróma által okozott bőrelváltozások mindenki számára ismertek, és a mindennapi klinikai gyakorlatban is nagy jelentőséggel bírnak, hiszen a betegek közel felének van bőrgyógyászati panasza. Elhízás során a megnagyobbodott

zsírsejtek szabad zsírsavakat és egyéb citokineket termelnek, melyek a kötőszöveti struktúrproteinek degradációját okozzák.

A homozigóta obes egerekben a leptint kódoló *ob* gén mindkét allélja hibás, ennek következtében leptint nem tudnak előállítani, ezért rendkívül falánkká válnak, ami extrém fokú elhízáshoz vezet. Az elhízás következtében 2. típusú diabéteszre jellemző elváltozások tapasztalhatók: magas vércukorszint, inzulin rezisztencia, hyperphagia, hiperglikémia, glükóz intolerancia, infertilitás és elégtelen sebgyógyulás.

Ebben a hosszútávú kísérletben az elhízás hatásait vizsgáltuk a dermális kollagén szerkezetére és a szubkután zsírsejtek növekedésére *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel. Ezt a jelenséget már korábban molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel igen részletesen megvizsgálták, mi azonban fontosnak tartottuk a folyamatok időbeli követését a különböző nemlineáris képalkotó módszerek segítségével diabéteszes állatmodellen, mely által a jövőben lehetségessé válhat a cukorbetegséggel járó kötőszöveti elváltozások korai felismerése.

2.3 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel különböző diétán tartott C57BL/6 egereken

Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a nemlineáris képalkotó módszerek segítségével az elhízás okozta kötőszöveti elváltozások hatékonyan nyomon követhetők, a jelenséget egy másik aspektusból is megvizsgáltuk. A leptin deficiencia egy nagyon ritkán előforduló genetikai rendellenesség, amely már kisgyermekkorban nagyon súlyos, extrém fokú elhízáshoz vezet. A humán elhízás modellezésére ezért vad típusú C57BL/6 egereket tartottunk magas zsírtartalmú, illetve magas cukortartalmú diétán. A hosszútávú magas zsírtartalmú étrend elhízáshoz, majd a metabolikus szindróma kialakulásához vezet. A 20% fruktózt tartalmazó ivóvíz a szöveti glikáció indukálására alkalmas.

Munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogy a dermális kollagén szerkezete illetve a szubkután zsírsejtek nagysága hogyan változik a különböző diéták függvényében. Ezek követésére az előző kísérlethez hasonlóan *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszert alkalmaztunk.

2.4 Ultrarövid impulzusú Ti:S szilárdtest lézer és Yb optikai szállézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata

Az *in vivo* képalkotás alapvető követelménye, hogy a lézer fényforrás ne okozzon maradandó károsodást a bőrben. Az irodalomban megjelent biztonságtechnikai vizsgálatokkal kapcsolatos ellentmondásos publikációk miatt fontosnak tartottuk az általunk használt Ti:S szilárdtest és Yb optikai szállézer fényforrások esetleges fotokémiai és termikus károsító tényezőinek felmérését. Lézerrel történő munka során a DNS háromfotonos abszorpciója következtében, az UVB sugárzás által okozott károsodásokhoz hasonlóan, CPD-k képződhetnek, melyek elégtelen reparáció esetén kiinduló elemei lehetnek egy esetleges mutációnak a hámsejtekben. A fototoxikus folyamatok mellett a termikus károsodás esélye is megnövekedett. Az infravörös fény egyfoton abszorpciója jelentős hőmérsékletemelkedést okozhat, ezzel károsítva a mintát.

Diagnosztikai szempontból legfontosabb követelmény a nagy felbontású, jó minőségű felvételek készítése. Ehhez definiálnunk kell azokat a lézer paramétereket, melyek ezt lehetővé teszik:

- gerjesztő lézer hullámhossz
- ismétlési frekvencia
- impulzus hossza (csúcsintenzitás)
- átlagteljesítmény
- expozíciós idő

A megfelelő képet úgy definiálhatjuk, hogy az adott optikai elrendezéssel olyan felvételek készíthetők, ahol a jelszint meghaladja a zajszintet. Célunk, hogy olyan beállításokkal sikerüljön jó minőségű képeket készíteni, amik nem okoznak sem fotokémiai, sem termikus károsodást a bőrben.

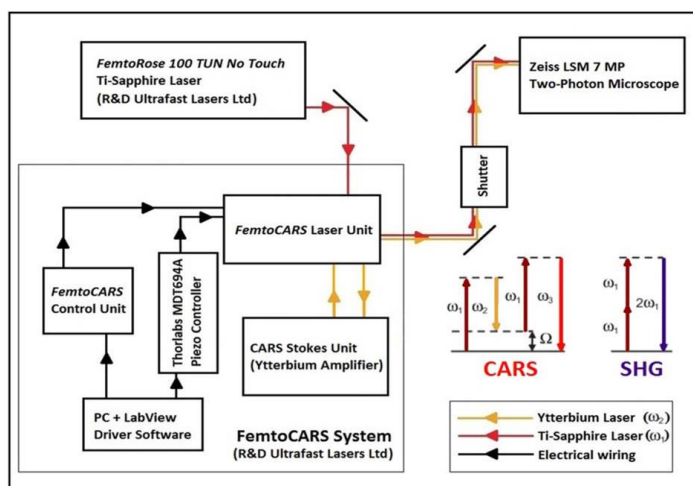
Munkánk során tehát a különböző károsodásokat detektáltuk, melyek a képalkotáshoz szükséges megfelelő paraméterek, mint például a teljesítmény vagy hullámhossz definiálásában voltak segítségünkre.

3. Módszerek - Kísérleti eljárások közleményenként

3.1 Nanomedicinák bőrön történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

3.1.1 Langerin-EGFP-DTR *knock in* egér modell, *in vivo* mérés

A mérések során használt Langerin-EGFP-DTR *knock in* egerek (Charles River, Németország) bőrében lévő Langerhans sejtek zöld fluoreszcens proteinnel (eGFP) jelöltek [100]. Az állatokat 1,2 % Avertin oldattal altattuk, majd a fülüket VetBound (3M, St Paul, MN) szöveti ragasztóval tárgylemezre rögzítettük. Az állatok egyik fülét egy speciális szivacs a DermaPrep (Genetic Immunity, Magyarország) segítségével megdörzsöltük, ezáltal a stratum corneumot fellazítottuk. A fülre körülbelül 2 μ l mennyiségű DermaVir (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) oldatot cseppentettünk, majd száradni hagytuk és az anyag penetrációját 1 óra elteltével mértük CARS mikroszkópiával. A mérés során arra voltunk kíváncsiak, hogy a képalkotó módszer képes-e a festékjelöléstől mentes DermaVir részecskéket saját rezgési spektrumuk alapján azonosítani. Elsőként szilárd halmazállapotú festékjelölés-mentes, majd a kezeléseknél használt hígított oldat CARS méréseit végeztük el és ezután következtek az *in vivo* mérések. A CARS rendszerhez két különböző impulzusüzemű lézer fényforrásra van szükség: egy 796 nm-en működő Ti:S pumpa lézerre, és egy 1030 nm-re állított Yb szál erősítőre, melyek az ún. anti-Stokes jelet hozzák létre együttesen. A két lézer impulzusai szinkronizáltak, egyszerre érik el a mintát és a CARS folyamat révén gerjesztik azt, melynek eredménye az anti-Stokes jel (12. ábra).



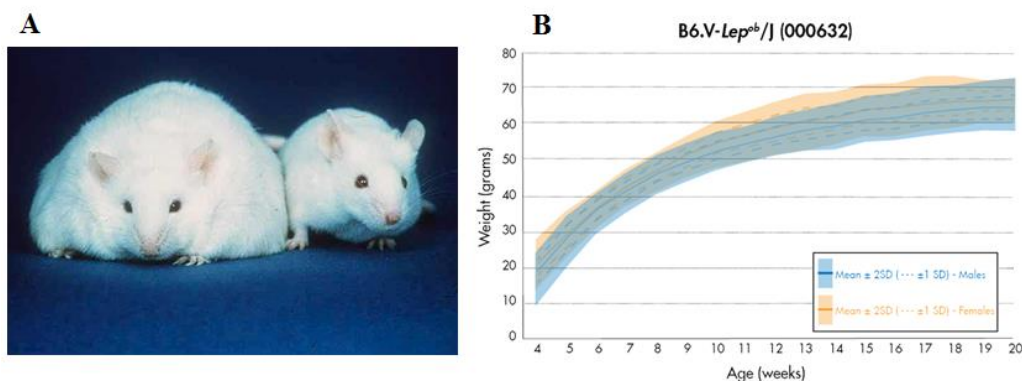
122. ábra A CARS mérőrendszer blokk diagramja. Az ábrán az SHG és CARS leképező rendszerek fő komponenseit, egységeit és a lézertény útvonalt ábrázoltuk. Részletes leírás: [101, 102]

Később ugyanezzel a kísérleti elrendezéssel a *FiberScope* leképező rendszerrel is elvégeztük a méréseket, a készülék használhatóságának tesztelésének céljából *in vivo* farmakológiai célokra. Ebben az esetben azonban a Alexa546 festékjelölt DermaVir oldatot használtunk, melyet a szállézer 1030 nm hullámhossza nagy hatásfokkal tud gerjeszteni, és a festék fluoreszcenciáját a készülék „piros” csatornáján mértük. A mintára eső teljesítmény ~ 8 mW volt, a mérés során 20x víz immerziós objektívet használtunk. A képalkotás során 25 μ s expozíciós időt illetve 256 pixel felbontást állítottunk be, 200 μ m x 200 μ m területen. A mintáról sorozatfelvételeket készítettünk 35-40 μ m mélységig, 3 μ m-enként.

3.2 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermalis kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken

3.2.1 Leptin deficiens egér modell, diéta, *in vivo* mérés

Leptin deficienciát a hormont kódoló *ob* gén nonszensz mutációja okozza, így homozigóta példányokban a leptin teljesen hiányzik. Ezek az egerek születéskor még nem különböznek normál – leptint termelő – társaiktól, de 3-4 hét elteltével a kontroll nélküli táplálékbevitel okozta testsúlygyarapodás szemmel látható (13. ábra/A). 10 hetes korukra testsúlyuk akár háromszorosát is meghaladhatja egy normál egérének (13. ábra/B).



133. ábra A: Leptin deficiencia miatt elhízott (balra), és egy normál egér (jobbra) összehasonlítása
B: Leptin deficiens egerek tömegének növekedése az életkor függvényében: hormon hiányában ezek az állatok falánkká, ezáltal extrém elhízottakká válnak. Egy normál egér tömege átlagosan 25-28 g, az *ob* knockout egerek tömege már 8 hetesen szinte duplája egy normál egérének. Az elhízás következtében a 2. típusú diabéteszre jellemző tünetek tapasztalhatók, ezért a cukorbetegséggel kapcsolatos kutatások kedvelt állatmodelljei (<http://jaxmice.jax.org/strain/000632.html>).

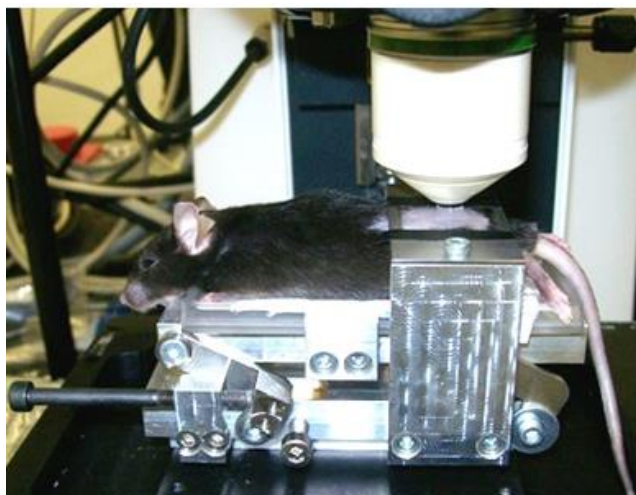
Az elhízás következtében a 2. típusú diabéteszre jellemző tünetek tapasztalhatók: hiperglikémia, glükóz intolerancia, magas inzulin koncentráció a vérplazmában, elégtelen sebgyógyulás. Az elhízás során a zsírsejtek száma (hiperplázia) és mérete (hipertrófia) is megnövekszik.

Kísérletünkben 4 darab 8 hetes nőstény genetikailag módosított leptin deficiens egeret B6.V-*Lept^{ob}/J* (Charles River, Olaszország) vizsgáltunk 30 héten keresztül. Az állatokat kettesével két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot kalória restriktív diétán tartottunk (*ob/ob* – KRD), ami azt jelenti, hogy az állatok a hét első öt napján egy darab 2g-os pelletet kaptak a hagyományos laboratóriumi takarmányból (MZ, complete feed for mice, SSNIFF, Németország). A hatodik napon dupla mennyiséget fogyaszthattak, majd a hetedik napon nem kaptak takarmányt [103]. A másik csoportot *ad libitum* tápláltuk standard táppal (*ob/ob* – ND). Kontroll csoportként 2 darab korban és nemben megegyező C57BL/6 egeret (Charles River, Olaszország) használtunk, *ad libitum* normál diétán tartva (kontroll). Az állatok tömegét hetente egy alkalommal mértük. Összefoglalva tehát a következő 3 csoportot vizsgáltuk:

1. 2 db *ob/ob* egér – *ad libitum*
2. 2 db *ob/ob* egér – kalória restriktív
3. 2 db C57BL/6 egér – *ad libitum*

Munkánk során a kollagén szerkezeti változásainak nyomon követésére az SHG módszert alkalmaztuk *in vivo*, négy alkalommal, a 8. 16. 24. és 30. héten.

Az állatokat intraperitoneálisan beadott 1,2%-os Avertin oldattal (Sigma Aldrich Kft., Magyarország) elaltattuk, majd a háti részt villanyborotva segítségével szőrtelenítettünk. Annak érdekében, hogy leképezés közben az állat mozgását minimalizáljuk, és a vizsgálni kívánt bőrterületet fixálni tudjuk, a fizikus kollégák egy speciális „egérrögzítő” építettek, mely a további *in vivo* mérések során is segítségünkre volt (14. ábra). A vizsgálni kívánt bőrterületre vizet cseppentettünk, majd egy fedőlemezt helyeztünk rá, amit a tartó két oldalához csavaroztunk, így rögzítettük a mintát. A mérés során 5 különböző területen végeztünk méréseket, melyeket manuálisan állítottunk be.



144. ábra Az *in vivo* mérések során használt „egérrögzítő” eszköz felépítése. A vizsgálni kívánt bőrterületet egy fedőlemez segítségével rögzítjük, így képkalkotás közben a mozgás minimális.

3.2.2 *In vivo* SHG és *ex vivo* CARS rendszer mérési beállításai

Az SHG módszer segítségével a kollagén állapotát négy mérés alkalmával vizsgáltuk. A lézer hullámhosszát ~796 nm-re állítottuk, a mintára eső átlagos teljesítmény 27-30 mW között volt. Képkalkotás során a jó minőségű, részletgazdag felvételek készítése volt a célunk, ezért az 1024-es felbontást választottuk, 12,61 μ sec pixel dwell time és 2-es átlagolás mellett. Minden állat esetében 5 darab sorozatfelvételt készítettünk a bőrről, 60 μ m mélységig 5 μ m-enként, 20x nagyításban. Ilyen beállítások mellett egy sorozatfelvétel elkészítése körülbelül 10 percet vett igénybe. A mérések ideje alatt a mintákon károsodást nem tapasztaltunk.

A kísérletben használt és a 3.1.1 fejezetben ismertetett CARS egység csak *ex vivo* mérésre volt alkalmas, ezért egy alkalommal, a kísérlet végén használtuk a zsírsejtek méretének meghatározására, amikor az állatokat termináltuk. Ebben az esetben egy 4 mm átmérőjű punch biopsziát vettünk a háti régióból és tárgylemezre helyeztük, hipodermális régióval felfelé. Minden egér mintájáról 3 darab sorozatfelvétel készült az SHG mérésekkel megegyező beállításokkal.

3.2.3 Szövettani analízis

A CARS mérésnél használt mintákat ezután formalinban tároltuk, és szövettani feldolgozásra küldtük. A rutin hematoxylin-eozin festés mellett van Gieson festés is készült, mely a kollagént különíti el a többi kötőszöveti rosttól. A szövettani metszetekről digitális felvételeket rögzítettünk, majd DigiMizer program segítségével határoztuk meg a dermisz vastagságot és a zsírsejtek területét. Minden egérhez kettő darab felvétel tartozott, felvételenként 20 területen határoztuk meg a dermisz vastagságot és 20 darab zsírsejt területét mértük le, majd az értékeket csoportonként átlagoltuk.

3.2.4 Adatok értékelése

Az SHG sorozatfelvételeket a WCIF ImageJ program segítségével értékeltük. A sorozat minden egyes képén 5 különböző területen határoztuk meg az SHG intenzitást, majd a kapott adatokat átlagoltuk. Csoportonként két SHG intenzitás értéket számoltunk ki. Az egyes mérési időpontokban a kontroll csoport eredményeit vettük 100%-os viszonyítási pontnak és ehhez viszonyítottuk a többi egércsoport SHG intenzitás értékeit. A dermisz vastagság és az adipociták méreteinek meghatározásánál az átlagokat hasonlítottuk össze. Az alacsony egyedszám, a statisztikai próbák megbízhatatlansága miatt szignifikanciát nem tudtunk megállapítani, azonban mindegyik érték összehasonlítása esetében jelentős eltéréseket figyeltünk meg a kísérlet előrehaladtával. Az átlagok összehasonlításának értékét növelte, hogy a kapott adatok szórása minden esetben alacsony volt, mely lehetővé tette a változások tendenciájának megbízható követését.

3.3 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel különböző diétán tartott C57BL/6 egereken

3.3.1 Diéták összeállítása, *in vivo* mérés

A leptin deficiens egereket vizsgálva valóban egy nagyon látványos és extrém elhízást tapasztalhattunk, mely a bőrben is markáns szerkezeti eltéréseket okozott. Humán esetekben azonban a leptin deficiencia egy nagyon ritka genetikai rendellenesség. A humán elhízás hitelesebb modellezésére ezért egy új kísérletet terveztünk, melyben nagyobb számú hagyományos laboratóriumi egeret vizsgáltunk. 20 darab 8 hetes nőstény C57BL/6 egeret osztottunk négy csoportra (5 db egér/csoport), melyeken különböző diéták dermális kollagénnre és szubkután zsírsejtekre gyakorolt hatásait követtük 32 héten keresztül. Az első csoport magas, 30%-os zsírtartalmú takarmányt fogyasztott, *ad libitum* (EF R/M with 30% fat, SSNIFF, Németország) (HFat). A második csoportot magas cukortartalmú diétán tartottunk, úgy hogy ivóvizük 20% fruktózt tartalmazott (HFru). Ezt a koncentrációt korábbi publikációk alapján határoztuk meg, és az ivóvízhez semmilyen adalékanyagot nem adtunk, ezért azt hetente kétszer cseréltük [104, 105]. A harmadik csoportot magas zsírtartalmú és magas cukortartalmú diétán tartottuk, tehát takarmányuk 30% zsírt, ivóvizük 20% fruktózt tartalmazott (HFHF). Kontroll csoportként nemben és korban megegyező C57BL/6 egereket vizsgáltunk, standard diétán tartva. Az állatok tömegét hetente egyszer, digitális mérleggel mértük. A kötőszöveti változások nyomon követésére *in vivo* SHG módszert alkalmaztunk, a kísérlet ideje alatt négy alkalommal, a 8. 16. 24. és 32. héten. Az *in vivo* SHG mérés az előző kísérletben ismertetett módon történt. A CARS módszert szintén, a vizsgálat végén egy alkalommal használtunk az adipociták méretének meghatározása céljából *ex vivo*.

3.3.2 *In vivo* SHG és *ex vivo* CARS rendszer mérési beállításai

Az előző kísérletben ismertetett főbb beállításokon – mint például a lézer fényforrások hullámhossza, mintára eső lézer teljesítmény, objektív – nem változtattunk. *In vivo* SHG mérés tehát összesen négy alkalommal történt. Minden állatról 5 darab sorozatfelvétel készült 70 µm mélységig 5 µm-enként. A gyorsabb, de

ugyanakkor jó minőségű felvételek készítéséhez 512x512 felbontást választottunk, valamint 6,3 μ sec pixel dwell time-ot, és kettes átlagolást. Ilyen beállítások mellett egy darab sorozatfelvétel elkészítése körülbelül 4 percet vett igénybe. Képalkotás közben a vizsgált mintákon károsodást nem tapasztaltunk.

Az adipociták *ex vivo* CARS méréséhez ismét egy 4 mm átmérőjű punch biopsziát vettünk a háti régióból, és az előző kísérlethez hasonlóan a hipodermális régióval felfelé helyeztük a mintát az objektív alá. Minden mintáról 3 darab sorozatfelvétel készült 512-es felbontás, 12,51 μ sec pixel dwell time, 2-es átlagolás beállításával. A sorozatfelvételek mélysége a zsírsejtek nagysága függvényében változott, de két horizontális felvétel közti intervallum minden esetben 3 μ m volt.

3.3.3 Szövettani analízis

Az előző kísérletben ismertetett módon végeztük. Az *ex vivo* CARS mérésre felhasznált mintákat vizsgálat után formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk és metszettük. A rutin hematoxilyn-eozin festés mellett Van Gieson festés is készült. A metszetekről digitális felvételeket készítettünk, majd Digimizer program segítségével határoztuk meg a dermisz vastagságát és – az előző mérési sorozattól eltérően – az adipociták területét.

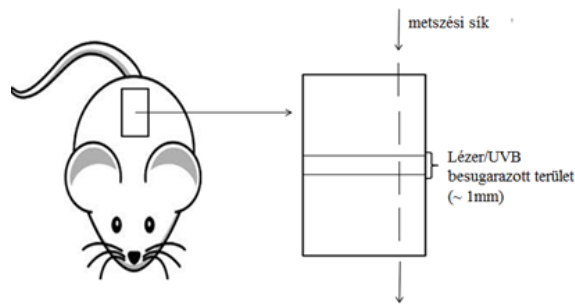
3.3.4 Adatok értékelése, statisztikai analízis

Az SHG intenzitás értékeket WCIF ImageJ program segítségével határoztuk meg. A csoportokra vonatkozó átlagos SHG intenzitás értékek közötti szignifikancia definiálására One-way ANOVA-t és Student T-testet használtunk. Az eltérést 95% konfidencia szint mellett, $p < 0,05$ értéknél fogadtuk el szignifikánsnak. A dermisz vastagságot és az adipociták területét a Van Gieson festett metszetek felvételei alapján határoztuk meg Digimizer program segítségével, majd a csoportonkénti szignifikancia értékeket Student t-test-tel számoltuk ki.

3.4 Ultrarövid impulzusú titán-zafír szilárdtest lézer és ytterbium optikai szállézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata

3.4.1 Az *in vivo* mérés, mintavétel, feldolgozás

A vizsgálathoz 8 hetes nőstény C57BL/6 egereket használtunk (Charles River, Németország). Az állatokat intraperitoneálisan beadott 1,2%-os Avertin oldattal (Sigma Aldrich Kft., Magyarország) elaltattuk, majd a háti részt villanyborotva segítségével szőrtelenítettünk és kijelöltünk egy 5 mm x 10 mm-es téglalap alakú területet, amit merőleges irányban sugaraztunk be lézeres, illetve UVB fényforrásokkal (15. ábra). A mérés végén a kijelölt bőrterületet kivágtuk, az egeret ezután Avertin oldattal túlaltattuk. A kivágott mintát 24 órán keresztül formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk és hosszanti irányban metszettük – így a pozitív sejtek könnyebben visszakereshetők – és elvégeztük az immunfluoreszcens jelölést.



15. ábra Az *in vivo* irradiáció sematikus rajza. Az egér hátán egy téglalap alakú területet jelöltünk ki, amit felületre merőleges irányban besugaroztunk UVB vagy lézer fényforrással. Ezt követően a mintát kivágtuk, formalinban inkubáltuk, majd paraffinba ágyaztuk és hosszanti irányban metszettük, hogy az immunfluoreszcens jelölést követően a pozitív sejtek könnyen azonosíthatóak legyenek.

3.4.2 Immunfluoreszcens jelölés

A metszeteket 2 x 5 percig xilolban, majd leszálló alkoholsorban (Molar Chemicals Kft., Magyarország) 5 percig deparaffináltuk, ezután desztillált vízben mostuk 10 percig. A sejtfeltárást 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich Kft., Magyarország) oldattal 5 percig jégen végeztük. A DNS denaturálása 2M HCl oldattal történt, 30 percig szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően 5%-os BSA oldattal blokkoltuk 30 percig szobahőmérsékleten a mintákat az aspecifikus kötések kialakulásának elkerülése érdekében. Ezután a mintákra ráértük az elsődleges antitestet 1:100 hígításban (monoclonal anti-CpD, TDM2, Cosmobio, Japan), majd ezeket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Másnap a mintákat mostuk, majd a másodlagos Alexa 514 antitestet is hozzáadtuk (goat anti-mouse, Life Technologies, Magyarország) és sötétben, szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk. Mosást és szárítást követően a mintákat VectraShield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) fedő médiummal fedtük.

Pozitív kontrollként 100 mJ/cm² dózisu UVB-vel besugarazott (FS20T12-UVB-BP, Philips) egér hátbőrt használtunk, a 14. ábrán ismertetett módon. Az immunfluoreszcens jelölés specifikusságát elsődleges antitest kontrollokkal is ellenőriztük. A mintákat Zeiss konfokális mikroszkóppal értékeltük, és a metszetekről digitális felvételeket készítettünk.

3.4.3 Lézer beállítások

A besugarazást hagyományos Carl Zeiss gyártmányú pásztázó kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal (Axio Examiner LSM 7 Carl Zeiss, Germany) végeztük, melynek fényforrása egy hangolható, nagy teljesítményű, impulzusütemű titán-zafír (Ti:S) szilárdtest lézer (FemtoRose 100 TUN NoTouch, R&D Ultrafast Lasers Kft., Magyarország). A lézer módusa TEM 00, ismétlési frekvenciája ~76 MHz, impulzushossza a mintán ~190 fs volt – ezeket az értékeket az 1. táblázatban külön nem tüntettük fel, ahol az egyéb mérési paramétereket, beállításokat foglaltuk össze. A DNS háromfotonos gerjesztése szempontjából a 750 nm-es hullámhossz biztonsági kockázata a legnagyobb, ezért ebben az esetben két mérési sorozatot végeztünk, egy nagyobb és kisebb teljesítmény mellett. A kollagén detektálására a 800 nm-es vagy annál hosszabb hullámhosszak alkalmasak, ezért gondoltuk fontosnak

ennek biztonságtechnikai kockázatainak felmérését. A hosszabb 1030 nm-es hullámhossz pedig a jövőben használni kívánt Yb szállezer működési hullámhossza.

Képkalkotás szempontjából további fontos paraméter a „pixel dwell time”, mely azt az időt jelenti, amit a fókuszált lézersugár egy képpontban eltölt. Ezt nevezhetjük az egy pontra eső expozíciós időnek is. Az átlagolás a digitális képek jel-zaj viszonyát fogja növelni, ezáltal azok kontrasztosabbá válnak.

	Hullámhossz	Teljesítmény	Felbontás	Pixel Dwell Time	Átlagolás	Z-stack/Interval	Objektív
1.	Ti:S 750 nm	~ 60 mW	512 x 512	1,58 μ sec	16	30 μ m/ 3 μ m	20x W
2.	Ti:S 750 nm	~ 25 mW	1024 x 1024	6,3 μ sec	2	30 μ m/ 3 μ m	20x W
3.	Ti:S 800 nm	~ 25 mW	1024 x 1024	6,3 μ sec	2	30 μ m/ 3 μ m	20x W
4.	Ti:S 1030 nm	~ 25 mW	1024 x 1024	6,3 μ sec	2	30 μ m/ 3 μ m	20x W
pozitív kontroll – UVB 312 nm – 1 J/ cm ² – 20 perc							

1. táblázat: A biztonságtechnikai mérési sorozat beállításai

Méréseinket 20x vizes objektívvel végeztük (W-Plan – APOCHROMAT 20x/1,0 DIC (UV) VIS-IR, Carl Zeiss, Germany), ezáltal a pásztázott terület 606 μ m x 606 μ m volt. A minta pontos keresztirányú pozicionálását egy szoftveresen beállítható tárgyasztal segítségével tudtuk kivitelezni (AxioVision). Mivel a leképezett terület nagyságát pontosan tudjuk a koordináták megadása után a szoftver pontosan 606 μ m-rel léptette a megfelelő irányba a tárgyasztalt. Minden területről 30 μ m mélységig készítettünk sorozatfelvételeket – illetve exponáltuk a mintát – 3 μ m-enként.

3.4.4. Yb szállezer biztonságtechnikai vizsgálata

A fent ismertetett módszerhez hasonlóan az Yb szállezer biztonságtechnikai vizsgálatát is elvégeztük *in vivo* egér hátbőrön. A mérésekhez használt Yb-szállézeres erősítő rendszer ismétlési frekvenciája 2,36 MHz, középhullámhossza ~1030 nm, sávzélessége ~10 nm, impulzushossza ~ 0,5 ps volt. Az optikai szállezer fényét ehhez kollimáltuk, beállítottuk polarizációját illetve impulzushosszát egy megfelelően beállított kompresszorral, majd terelőtükrök segítségével bevezettük a Carl Zeiss pásztázó mikroszkópunkba, így a minta levilágítása hasonló mérési körülmények között

zajlott, mint a Ti-zafír esetében. Ebben az esetben azonban a *FiberScope* tervezett működési paramétereivel ekvivalens értékeket használtuk:

- 20x W objektív
- 303 μm x 303 μm terület
- 512 x 512 pixel felbontás
- 25 μsec pixel dwell time
- 6 mW mintára eső teljesítmény
- $\lambda = 1030 \text{ nm}$

A minta feldolgozása, jelölése és kiértékelése a fenti mérési sorozattal megegyező módon történt.

3.4.5 Termikus károsodás vizsgálata

A kavitáció a hosszabb hullámhosszak alkalmazásánál megfigyelhető jelenség, mely az infravörös fény egyfoton abszorpciójával hozható összefüggésbe. Kavitáció során jelentős hőmérsékletemelkedés tapasztalható a vizsgált mintában, mely károsíthatja a fehérjéket illetve a DNS-t.

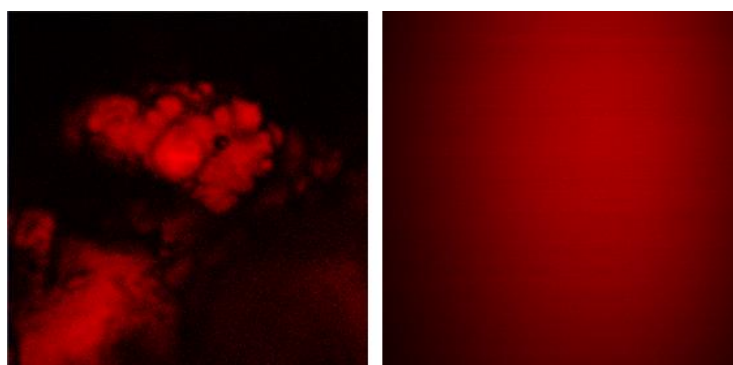
Munkánk során elsőként a Ti:S szilárdtest lézer hőkárosító hatását vizsgáltuk 8 hetes C57BL/6 nőstény egereken. Az állatokat 1,2 %-os intraperitoneális Avertin oldattal altattunk, majd kétoldalú ragasztó segítségével rögzítettük az egérfület a tárgylemezhez, és így helyeztük az objektív alá. A mérést két mélységben az epidermisz-dermisz határán és a dermisz rétegében hajtottuk végre. Különböző hullámhosszak használatával (740, 760, 800 nm) folyamatosan növeltük a teljesítményt egészen addig, míg kavitációt nem tapasztaltunk, általában 30-150 mW-ig. A mintára eső teljesítményeket ThorLabs PM-100-as lézer teljesítménymérőjével mértük. A károsodás területén túlexponált pixelek vagy sötét foltok jelennek meg. A mérés ideje alatt 512-es felbontást és 6,3 μsec pixel dwell time-ot használtunk, melyeken nem változtattunk. Később hasonló módszerrel teszteltük az Yb szállézert is. Az alacsony, 3,6 mW-os teljesítmény miatt kis területet vizsgáltunk, és a pixel dwell time-ot folyamatosan növeltük 6,3 μsec -ról, 12,61 μsec , 25,21 μsec , 50,42 μsec , majd végül 100,85 μsec -ra.

4. Eredmények

4.1 Nanomedicinák bőrön történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

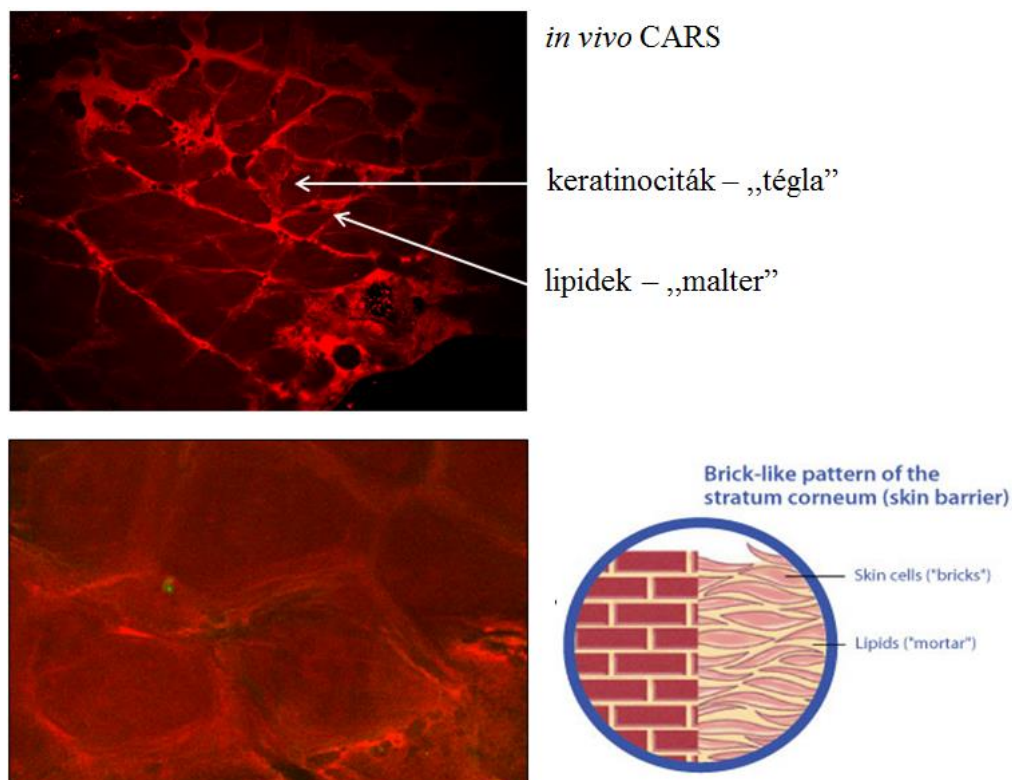
4.1.1 CARS mikroszkópiás mérési eredmények

A CARS módszer segítségével a szerves molekulák jellegzetes rezgési spektrumuk alapján azonosíthatók, ezért úgy gondoltuk, hogy az általunk monitorozni kívánt DermaVir részecskék PEIm komponense is rendelkezik egy sajátos, csak rájuk jellemző rezgési spektrummal. A szilárd halmazállapotú festékjelölés-mentes minta és a megfelelő koncentrációban hígított oldat mérése esetében is karakterisztikus CARS jelet sikerült detektálnunk (16. ábra).



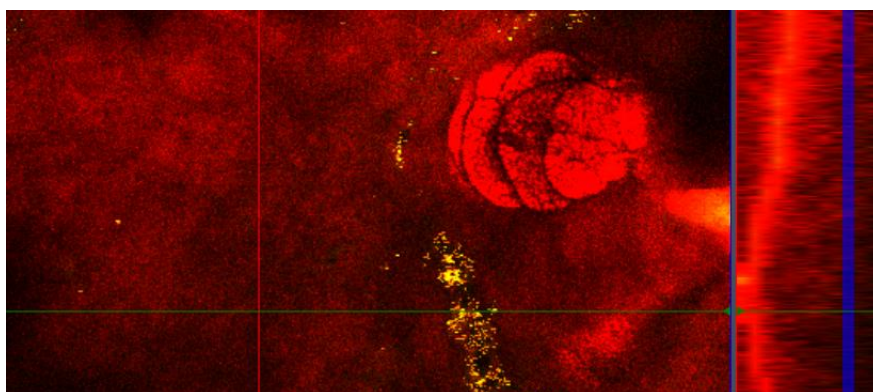
16. ábra PEIm por részecskék (bal oldal) és PEIm vizes oldata esetében mért CARS jel a CARS mikroszkópban

A PEIm és lipidek CH_2 kötéseiből származó CARS spektrumok hasonlósága miatt egy kezeletlen bőrfelületről CARS képet készítettünk a 3.1.1 fejezetben leírt beállításokkal. Ezután kérdésként merült fel, hogy a két anyagból származó CARS jel majd az *in vivo* mérések során mennyire és milyen módon különíthető el a bőr különböző mélységeiben.



17. ábra Kontroll *in vivo* bőrmintáról készített CARS mikroszkópiás képek. A bal oldali különböző nagyításokkal készített képeken jól láthatóak a keratinociták közötti réseket kitöltő intracelluláris lipidek, még jobb oldalon a bőr barrier szerkezetét bemutató „tégla” és malter” modell.

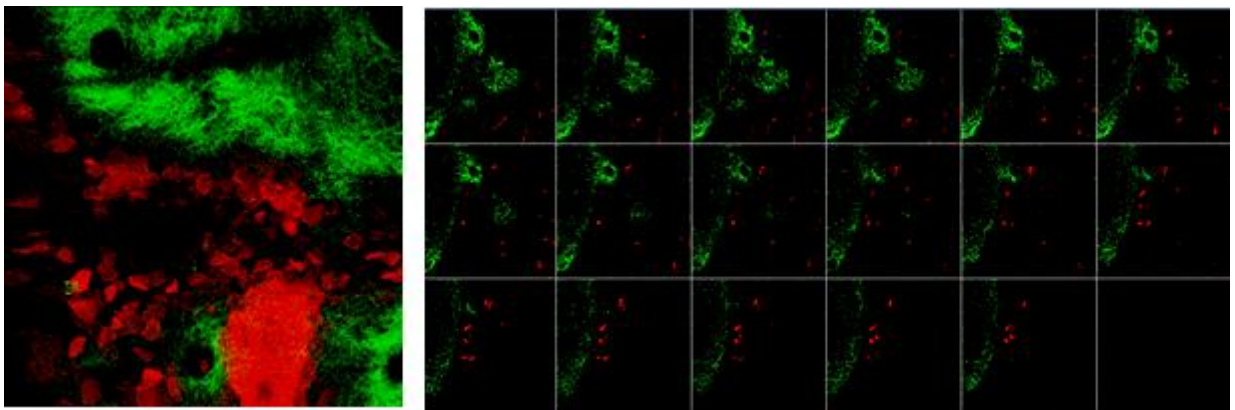
Az *in vivo* mérési eredmények értékelése során azzal a problémával kellett szembesülnünk, hogy az epidermiszben jelen levő intracelluláris lipidekből illetve egyéb lipid-tartalmú sejtkomponensekből származó CARS jel (17. ábra) az általunk vizsgálni kívánt DermaVir PEIm komponensével átfed. Ez a mérés szelektivitását jelentősen befolyásolja (18. ábra).



18. ábra PEIm részecskék *in vivo* penetrációjának vizsgálata CARS módszerrel

4.1.2 *FiberScope* mérési eredmények

Ebben a kísérletben a fejlesztés alatt álló *FiberScope* készülék alkalmazhatóságát kívántuk tesztelni *in vivo* farmakológiai célokra. Az alkalmazott hosszabb 1030 nm hullámhossz az Alexa546 gerjesztéséhez megfelelő, és a mikroszkóp piros csatornáján a jelölt DermaVir oldat detektálható. Eredményeink értékelése során azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan a hagyományos Zeiss kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal végzett *in vivo* mérésekhez [47], a DermaPrep-pel kezelt bőrben lévő Langerhans sejtek 1 óra elteltével felveszik a bőr felületére felvitt Alexa546-tal jelölt DermaVir-t, és azok kirajzolják a bőrben lévő Langerhans sejteket a piros csatornában (19. ábra). Ebben az esetben a zöld csatornán a kollagén SHG jele látható, az EGFP-vel jelölt Langerhans sejtek az 1030 nm hullámhosszon nem detektálhatók.



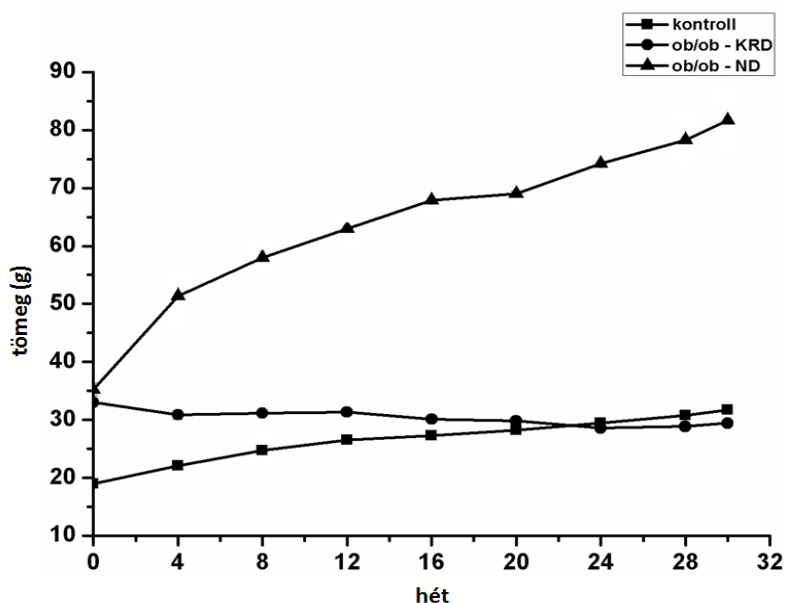
19. ábra Alexa546 jelölt DermaVir nanorészecske (AF546-DV) *in vivo* penetrációs vizsgálata egérbőrön *FiberScope* nemlineáris mikroendoszkóppal, ~1030 nm-es gerjesztéssel. Zöld csatorna: kollagén SHG jele, piros csatorna: az AF546-tal jelölt DermaVir részecskék fluoreszcens jele a DermaPrep/DermaVir kezelést követő 1 óra múlva. A bal oldali képen jól látható, hogy a bőr felszínére felvitt AF546-DV kirajzolja a hatszögletes szarusejtek körvonalát. A jobb oldali „z-stack” felvétel sorozaton jól látszik, hogy a Langerhans sejtek 1 óra elteltével felveszik a bőr felszínére felvitt, festékjelölt AF546-DV részecskéket, ami kirajzolja a Langerhans sejtek elhelyezkedését a bőrben.

4.2 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermalis kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken

4.2.1 Tömeg

A kísérlet kezdetekor, amikor az állatok 8 hetesek voltak, a normál diétán tartott ob/ob egerek tömege még nem különbözött jelentősen a másik két csoport egyedeinek tömegétől. A kísérlet 4. hetétől azonban az *ad libitum* táplált leptin deficiens állatok tömege nagyon gyors növekedést mutatott, és ez a súlygyarapodás a 30. hétig megfigyelhető volt. A másik, szintén leptin deficiens egércsoport tömege a vizsgálat kezdetekor a normál egerek tömegének körülbelül másfélszeresét mutatta, a kalória megszorítás hatására azonban a 12. héttől a kontroll csoporthoz hasonló volt.

A kísérlet végére az *ad libitum* táplált ob/ob egerek tömege (átl. $63,35 \pm 4,31$ g) közel háromszorosára gyarapodott a kontroll (átl. $26,63 \pm 4,12$ g) és kalóriamegszorított (átl.: $30,33 \pm 1,39$ g) csoporthoz képest, míg ez utóbbi két csoport tömege a kísérlet ideje alatt stagnált (20. ábra).

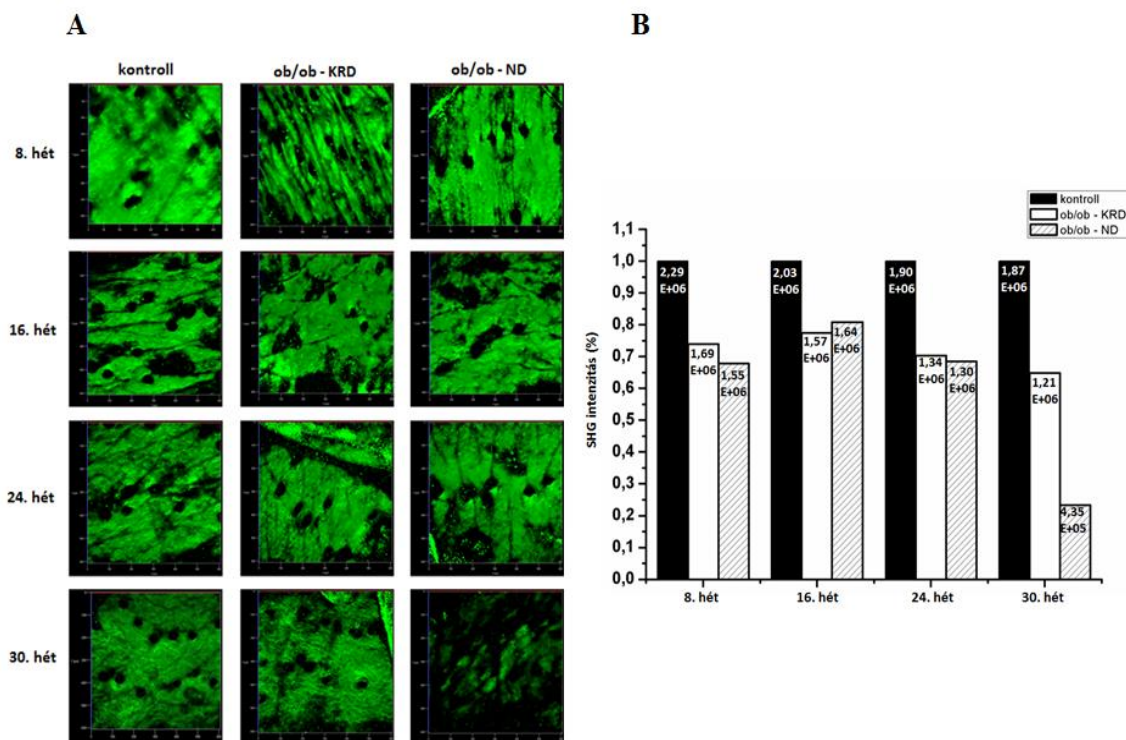


20. ábra: A kísérletben szereplő egércsoportok tömegének változása 30 héten keresztül. Az ábrán jól látható, hogy a leptin deficiens egércsoportok (ob/ob – ND, ob/ob – KRD) tömege a kísérlet kezdetekor, amikor az állatok 8 hetesek voltak, a kontroll csoport egyedeinek másfélszeresét mutatták. A normál diétán tartott ob/ob csoportot gyors súlygyarapodás jellemezte, már a kísérlet 4. hetétől. A kalória megszorított diétán lévő egerek tömege mérsékelt csökkenést mutatott, majd a kontroll csoport tömegével párhuzamosan stagnált a 12. héttől kezdve.

4.2.2 Kollagén morfológiai változásai

Az *in vivo* SHG mérések alkalmával az első három mérési időpontban még nem tapasztaltunk markáns különbséget a kontroll, kalóriamegszorított és *ad libitum* táplált ob/ob egér bőrének kollagén szerkezetében, azt azonban megállapíthattuk, hogy a kontroll csoport SHG intenzitás értékei minden mérési időpontban magasabbak voltak a másik két csoporthoz képest.

A negyedik mérési időpontban már jelentős, szemmel látható változásokat tapasztaltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a kalóriamegszorított diétán tartott ob/ob egér bőrének kollagén szerkezete szabályos, rostokban gazdag, a kontroll állathoz hasonló mind morfológiailag, mind SHG intenzitásban a vizsgálat teljes ideje alatt. Az *ad libitum* táplált ob/ob egér kollagén szerkezetére ezzel ellentétben már nem jellemző a jól megtartott szerkezetet, sőt egy markáns degradáció figyelhető meg a kötőszöveti rostokban, és az SHG intenzitás is jelentősen csökkent a 30 héten mért értékek alapján (21. ábra/A).

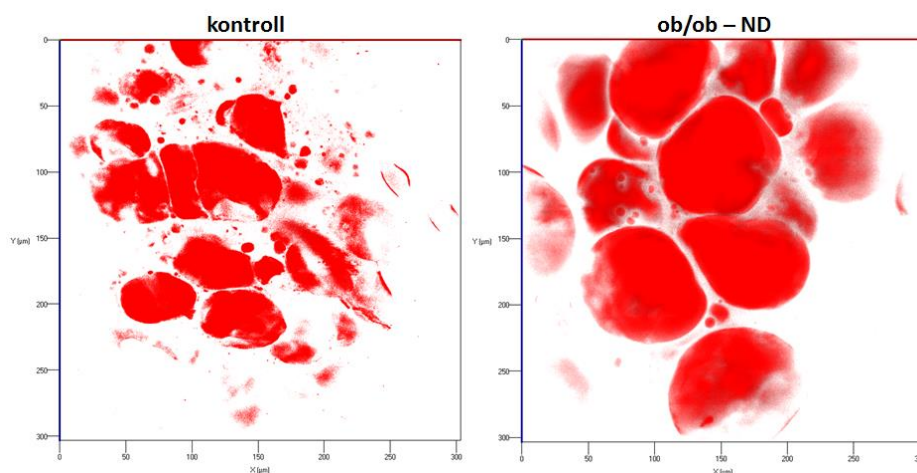


21. ábra A: A kollagén szerkezeti változásai a kísérlet ideje alatt kontroll, ob/ob – KRD és ob/ob – ND csoportban, *in vivo* SHG módszerrel vizsgálva. A z-stack sorozatfelvételeket összeillesztve egy felülnézeti képet láthatunk a kollagén szerkezetéről, $x = 606 \mu\text{m}$, $y = 606 \mu\text{m}$ területen. A kollagén degradációja jelentős SHG jelintenzitás csökkenést eredményez, mely jól látható a 30. héten az elhízott, leptin deficiens egerek csoportjában. **B:** A WCIF Image J programmal meghatározott SHG intenzitás értékeket normáltuk, tehát a kontroll csoport értékeit minden esetben 100%-nak vettük, és a többi csoport eredményeit ehhez viszonyítottuk. A csoportonkénti alacsony egyedszám miatt statisztikai próbákat nem végeztünk.

Eredményeink alapján tehát arra következtethetünk, hogy az *ad libitum* táplált leptin deficiens egerek esetében a kialakult metabolikus szindróma okozta elhízás és anyagcsere változások – mint például a szabadgyök képződés, glikáció, szabad zsírsavak megnövekedett szintje – okozzák a kollagén mennyiségének csökkenését és az SHG alacsony jelszintjét (21. ábra/B). Ezen kívül azt is megállapíthatjuk, hogy az elhízás mértéke negatív korrelációt mutat a kollagén mennyiségével és szerkezetével. A kalória restriktív diétán tartott ob/ob egerekben azt is megfigyeltük, hogy a kollagén mennyisége és szöveti eloszlása jelentősen nem változott a vizsgálat ideje alatt, igazolva azt, hogy nem a genotípus felelős a bőr szerkezetének megváltozásáért, hanem a metabolikus szindróma okozta elhízás és anyagcsere változások.

4.2.3 A szubkután zsírsejtek vizsgálata

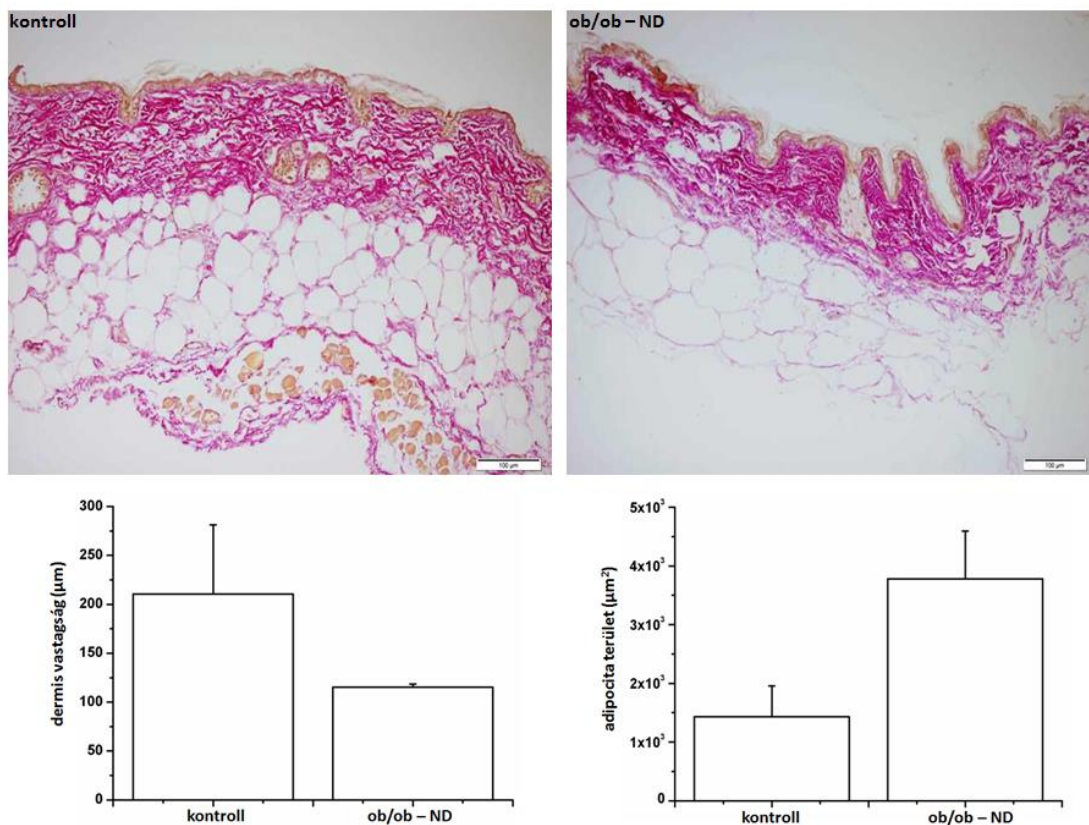
Az *ex vivo* CARS vizsgálatot a kísérlet végén a 30. héten végeztük, amikor egy 4 mm átmérőjű punch biopsziát vettünk az egerek háti régiójából. Ekkor már csak a kontroll és ob/ob – ND csoport mintáit vizsgáltuk. A kontroll csoport adipocita sejtjeihez képest az elhízott ob/ob – ND adipocita sejtjei szemmel láthatóan nagyobb kiterjedésűek voltak (22. ábra). Az adipociták méretét ebben a kísérletben nem objektívizáltuk, hiszen ennél a vizsgálatnál a CARS módszert először alkalmaztuk, és arra voltunk kíváncsiak, hogy ez a technika mennyire alkalmas a zsírsejtek jelölés nélküli képalkotására, ezáltal hogyan hasznosítható a jövőben a különböző dermatológiai kórképek diagnosztikájában.



22. ábra Szubkután adipociták *ex vivo* CARS vizsgálata kontroll és elhízott leptin deficiens eger mintán. A kontroll eger zsírsejtjei kisebb kiterjedésűek, míg az elhízott egerek adipocitái szemmel láthatóan nagyobb méretűek. A z-stack sorozatfelvételeket összeillesztve egy felülnézeti képet láthatunk az adipociták szerkezetéről, x = 300 μm, y = 300 μm területen.

4.2.4 Szövettani értékelés

Az SHG és CARS módszerekkel készült felvételek eredményeit hagyományos szövettani festésekkel ellenőriztük. Minden mintából hematoxylin-eosin és van Gieson festés készült. A dermisz vastagságot és az adipociták területét Digimizer program (Ostend, Belgium) segítségével határoztuk meg a Van Gieson festett metszetek digitális felvételei alapján.



23. ábra Felül: szövettani kiértékelés van Gieson festés alapján. A kontroll csoport kollagén szerkezete rost dús, szabályos szerkezetet mutat, míg az leptin deficiens egerek kötőszövetének degradációja igen kifejezett. Az ob/ob – ND csoport egyedeinek adipocita sejtjei 2,5-szer nagyobb kiterjedésűek voltak a kontroll csoporthoz viszonyítva. A megnövekedett zsírsejtek ezzel párhuzamosan a dermisz elvékonyodását idézték elő, így ennek értéke a kontroll csoportban volt magasabb.

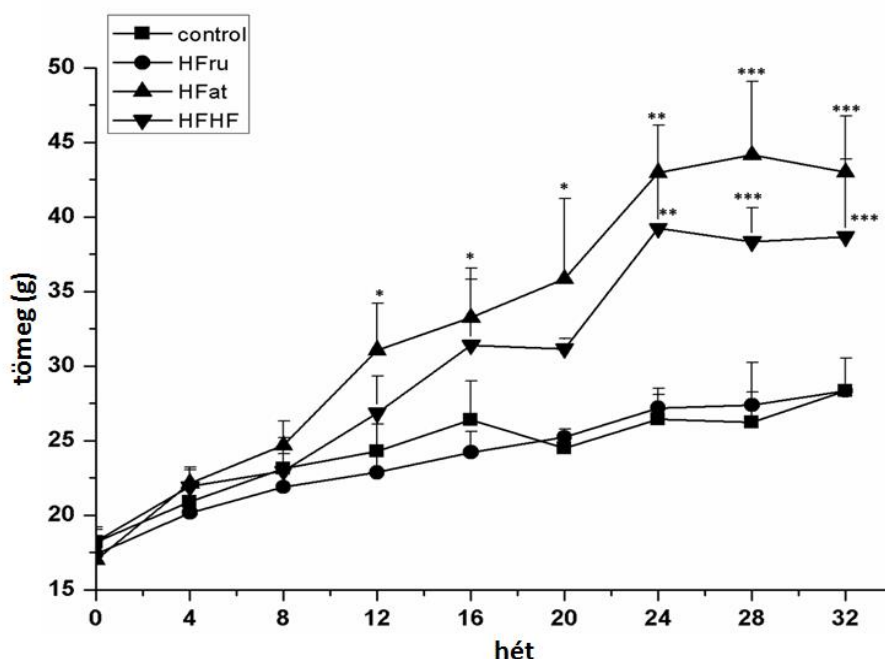
A dermális kollagén szerkezete az ob/ob – ND csoport mintáinak van Gieson festése alapján egyértelműen degradálódott szerkezetet mutatott, míg a kontroll csoport egereinek kötőszöve szabályos szerkezetű volt (23. ábra/felül). Az elhízott egerek szubkután zsírsejtjeinek átlagos területe 2,5-szer nagyobb ($3678,06 \mu\text{m}^2 \pm 984,95 \mu\text{m}^2$) volt a kontroll csoport egyedeinek adipocitái méretéhez ($1429,1 \mu\text{m}^2 \pm 316,25 \mu\text{m}^2$) képest. A dermisz vastagság ezzel szemben az ob/ob – ND csoportban közel másfélszeresére csökkent ($115,2 \mu\text{m} \pm 27,35 \mu\text{m}$) a kontroll csoporthoz képest ($210,42$

$\mu\text{m} \pm 8,4 \mu\text{m}$) (23. ábra/alul). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a megnövekedett adipociták valóban hozzájárulnak a dermális kollagén degradációjához és a dermisz elvékonyodását is előidézik.

4.3 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel különböző diétán tartott C57BL/6 egereken

4.3.1 Tömeg

A magas zsírtartalmú diétán tartott egerek tömege már a 12. héttől kezdve szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,05$) a kontrollokhoz képest, és a kísérlet végére közel másfélszeres súlytöbblet (átl.: $43 \text{ g} \pm 3,7 \text{ g}$) volt megfigyelhető a kontroll (átl.: $27,35 \text{ g} \pm 1,8 \text{ g}$) és HFru (átl.: $28,3 \text{ g} \pm 2,2 \text{ g}$) csoporthoz viszonyítva. Érdekeség, hogy azok az egerek, amelyek magas zsírtartalmú takarmányt és magas fruktóz tartalmú ivóvizet fogyasztottak a HFat csoporthoz képest kevésbé híztak el (átl.: $38,6 \text{ g} \pm 5,2 \text{ g}$), ugyanakkor a 24. héttől kezdve tömegük már szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,05$). A magas cukortartalmú diétán tartott egerek tömege jelentősen nem változott a vizsgálat ideje alatt, a kontroll csoport tömegének változásaival hasonló tendenciát mutatott (24. ábra).

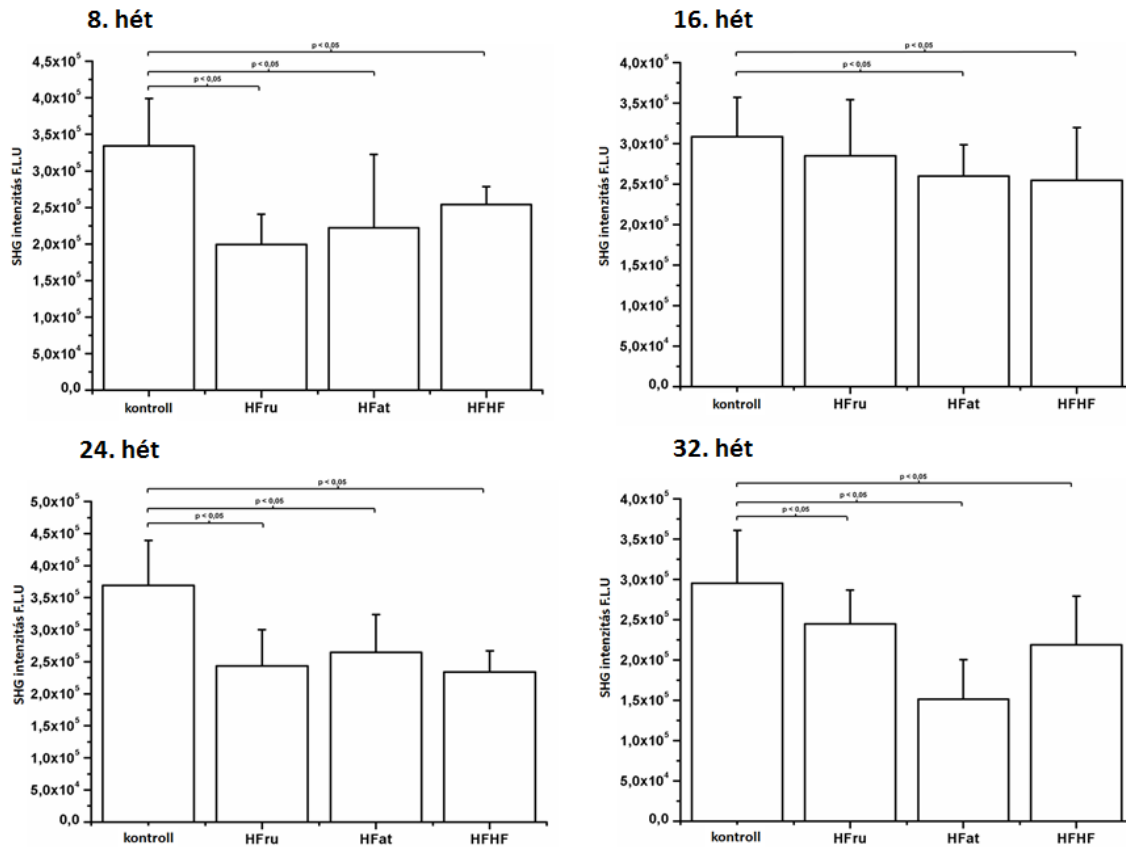


24. ábra Különböző diétán tartott egércsoportok tömegének változása 32 héten keresztül. A HFat csoport tömege a 12. héttől kezdve szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, még a HFHF csoport a 24. héttől ért el szignifikánsan magasabb testtömeget. A HFru csoportnál nem tapasztaltunk jelentős súlygyarapodást a kísérlet ideje alatt. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) szignifikáns különbség vs. kontroll csoport, Student's T-tesztel meghatározva. A hibavonalak: az időpontokhoz tartozó átlagos tömeg-értékek szórását mutatja.

4.3.2 Kollagén morfológiai változásai

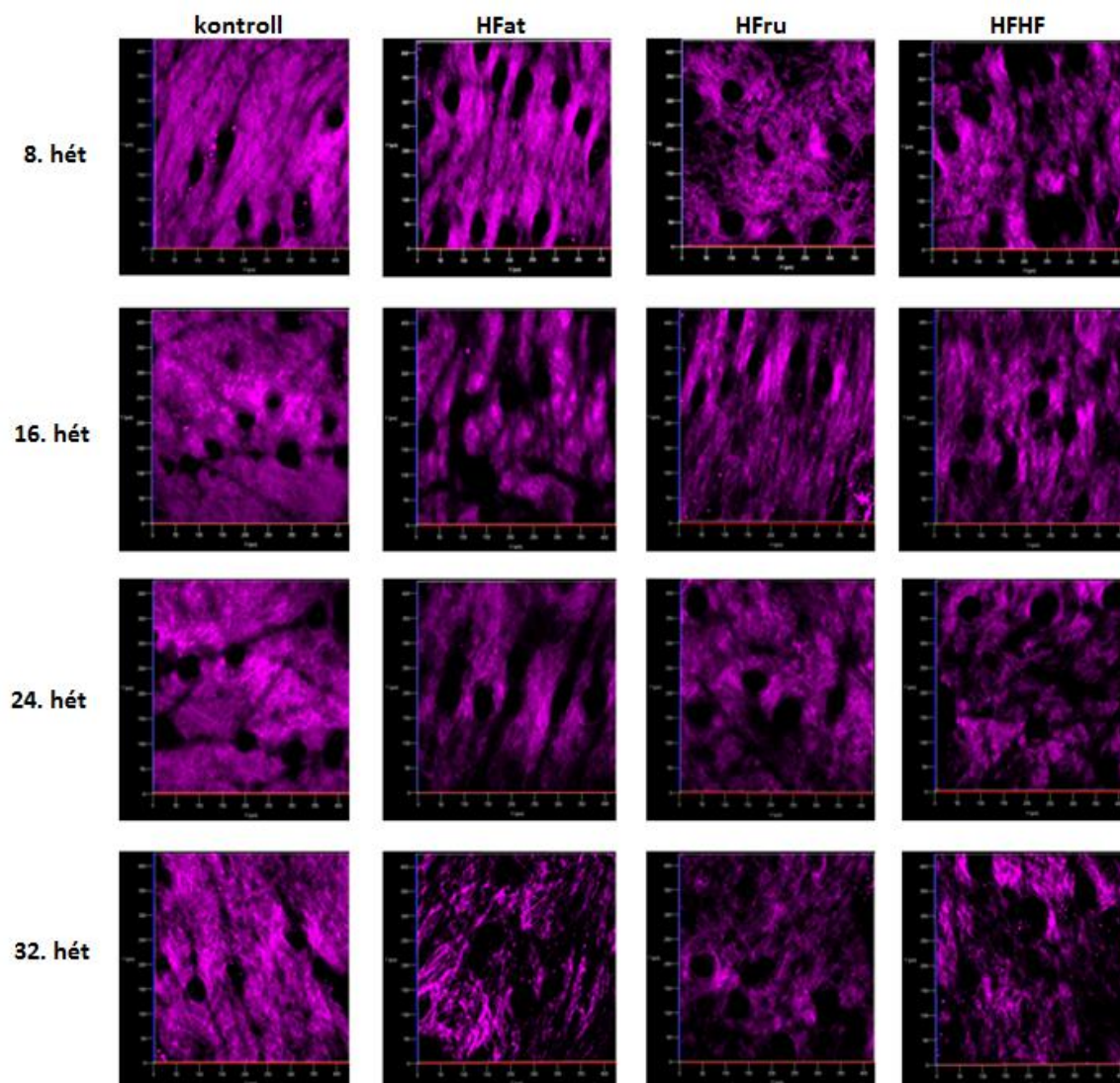
Az első mérési időpontban a mindhárom csoport SHG intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll egerek SHG intenzitásához képest. Ebben az esetben azonban meg kell jegyeznünk, hogy az állatok többsége szörnővekedési ciklusának anagén szakaszában volt, ami igen megnehezítette a szőrtelenítést, ezáltal a felvételek minősége sem volt kielégítő. Az első mérési időponthoz tartozó eredmények tehát fenntartásokkal kezelendők. A 16. héten a HFat és HFHF csoport SHG intenzitás értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontroll állatok SHG intenzitásához viszonyítva. Ezen kívül a magas cukortartalmú diétán tartott HFru egerek SHG intenzitásában egy mérsékelt, de nem szignifikáns csökkenést figyeltünk meg, szintén a 16. héten. A 24. és 32. héten, amikor a HFat és HFHF csoport egyedeinek tömege már majdnem duplája volt a kontroll állatokénak, az átlagos SHG intenzitás értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, főleg a HFat csoportban. Érdekeség, hogy a HFru csoport SHG intenzitás értékei minden mérési időpontban alacsonyabbak voltak a

kontroll csoporthoz képest, de szignifikáns különbséget csak a 24. és 32. héten tapasztaltunk (25. ábra).



25. ábra A különböző diétán tartott egércsoportok átlagos SHG intenzitás értékeinek változása a négy mérési időpontban.

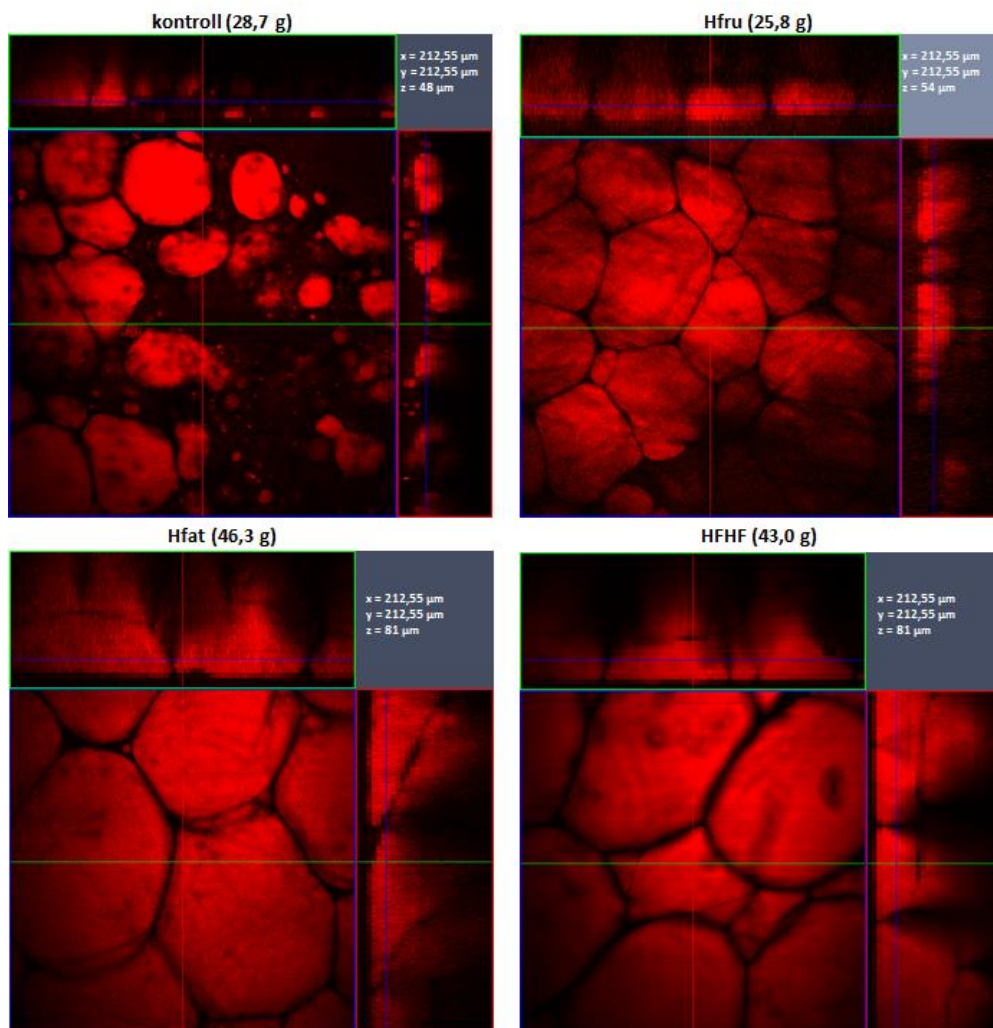
A kontroll csoport egereinek dermális kollagén struktúrája a vizsgálat ideje alatt egy relatív normál, rost dús szerkezetet mutatott. A HFat és HFHF csoportban az elhízás mértékével arányosan a kollagén szerkezetét egy folyamatosan degradáció jellemezte. A HFru csoport egereinek kollagén szerkezete egy kevésbé drasztikus, de szemmel jól látható változáson ment keresztül. A 32. héten azonban e csoport esetében is megfigyelhető volt a kollagén rostok mennyiségének csökkenése és degradációja (26. ábra).



26. ábra Dermális kollagén szerkezeti változásai *in vivo* SHG módszerrel vizsgálva a különböző mérési időpontokban. Az ábrák a z-stack sorozatfelvételek összeillesztésével készült, felülnézetben, $\Delta x = 404 \mu\text{m}$, $\Delta y = 404 \mu\text{m}$ területen. A kollagén degradációja a kontroll csoport kivételével mindhárom csoportban megfigyelhető a 16. héttől kezdve, mely következtében az SHG jelintenzitás nagymértékben csökkent.

4.3.3 A szubkután zsírsejtek vizsgálata

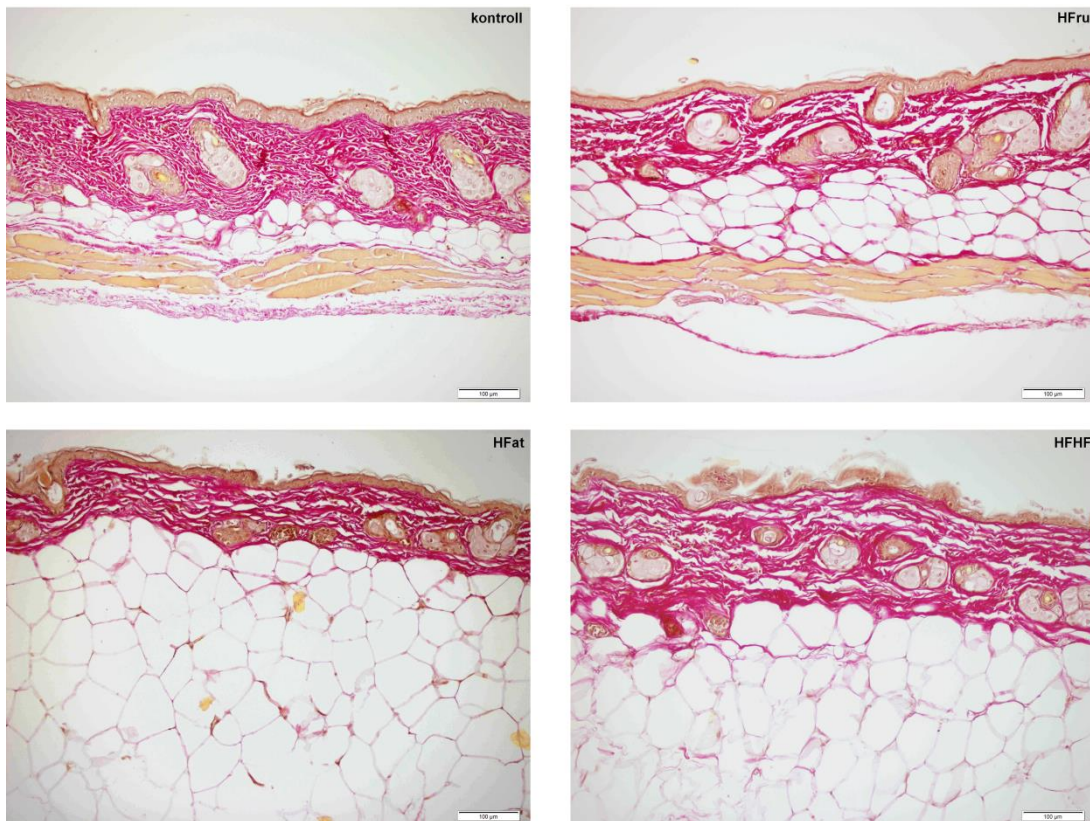
Az *ex vivo* CARS felvételek alapján a különböző egércsoportokra jellemző zsírsejtek méretbeli különbségei egyértelműen meghatározhatók. A 27. ábrán szereplő felvételeken az adipocitákat ortogonális nézetben ábrázoltuk, így egyszerre látható a sejtek területe és vastagsága is az x, y és z tengely mentén. A felvételeken jól látható, hogy a HFat és HFHF csoporthoz tartozó egerek szubkután zsírsejtjei lényegesen nagyobb kiterjedésűek a másik két csoporthoz képest. Továbbá a szubkután zsírszövet vastagsága körülbelül duplája a kontroll csoporténak. Érdekesség, hogy a HFru csoport egerei szintén vastagabb zsírszövettel rendelkeztek és az adipociták is nagyobb méretűek voltak, azonban az állatok tömege közel hasonló volt a kontroll csoportéhoz.



27. ábra A szubkután zsírsejtek *ex vivo* CARS vizsgálata.

4.3.4 Szövettani értékelés

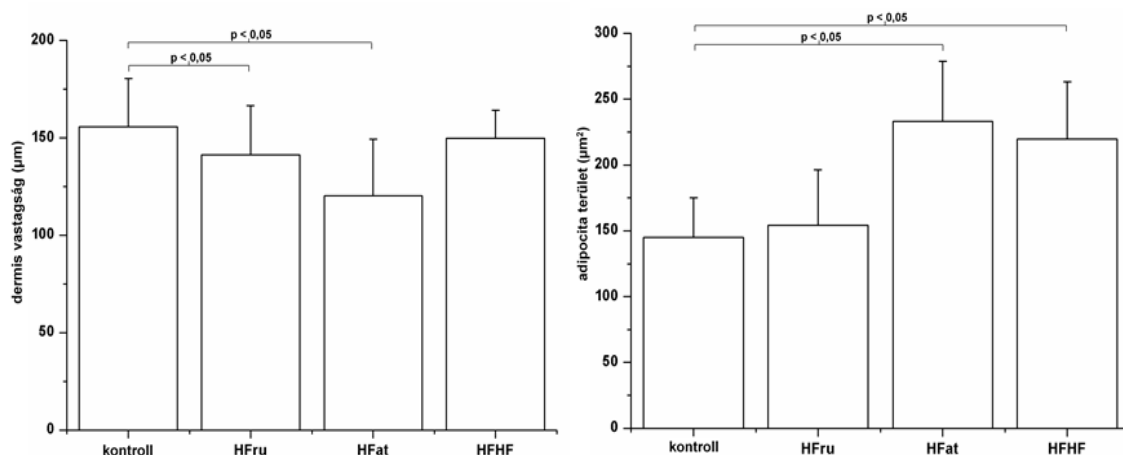
A van Gieson festett metszetek kiértékelése során azt tapasztaltuk, hogy a kollagén degradációja a HFat, HFHF és HFru csoportokban szemmel látható, míg a kontroll csoport mintáinak kollagén szerkezete szabályos szerkezetű, nem figyelhető meg károsodás. Ezzel párhuzamosan azt is tapasztaltuk, hogy a szubkután zsírszövet megvastagodása a dermisz elvékonyodását okozta. Ez főleg a HFat és HFru csoport egyedinek mintáján volt látványos. A szubkután zsírsejtek nagysága a kontroll csoporthoz képest a HFat és HFHF csoportban mutatott jelentős növekedést. A HFHF csoport mintáin a dermisz vastagsága nem csökkent szignifikánsan, azonban a dermális kollagén degradációja egyértelműen azonosítható (28. ábra).



28. ábra Különböző diétán tartott egerek hátbőrének van Gieson festéssel készült szövettani metszetei. A kontroll csoport mintájához képest mindhárom csoportban megfigyelhető a szubkután zsírsejtek növekedése, a zsírszövet megvastagodása, ezzel párhuzamosan a dermisz elvékonyodása és a kollagén degradációja. Méretvonal: 100µm

A szövettani metszetek digitalizálását követően a felvételeket Digimizer program segítségével értékeltük ki. Minden egérhez két felvétel tartozott, és felvételenként 20 helyen mértük a dermisz vastagságát, illetve mintánként 20 darab adipocita területét

határoztuk meg. Az eredményeket ezután átlagoltuk és a csoportok közötti szignifikanciát Student T-test-tel számoltuk ki.



29. ábra A szövettani kiértékelést követően a dermisz vastagsága szignifikánsan lecsökkent a HFat és HFru csoportban ($p < 0,05$), míg az adipociták kerülete a HFat és HFHF csoportban szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz képest.

A dermisz vastagsága a HFat ($120,15 \mu\text{m} \pm 14,56 \mu\text{m}$) és HFru ($141,23 \mu\text{m} \pm 12,65 \mu\text{m}$) csoportban szignifikánsan lecsökkent a kontroll csoporthoz képest ($155,58 \mu\text{m} \pm 12,36 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$). Érdekeség, hogy a HFHF csoport mintáiban ez nem volt megfigyelhető, azonban a kollagén degradációja egyértelműen azonosítható.

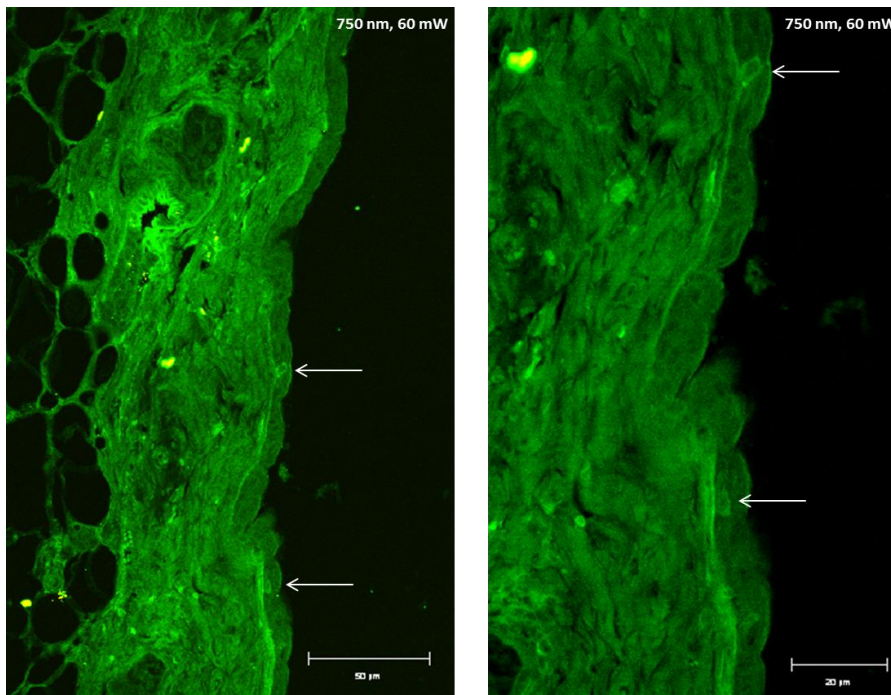
Az adipociták átlagos kerülete a HFat ($233,15 \mu\text{m} \pm 22,84 \mu\text{m}$) és HFHF ($219,63 \mu\text{m} \pm 21,84 \mu\text{m}$) csoportban szignifikánsan nagyobb kiterjedésű volt mint a kontroll ($145,13 \mu\text{m} \pm 14,93 \mu\text{m}$) és HFru ($154,05 \mu\text{m} \pm 21,19 \mu\text{m}$) csoportban (29. ábra).

4.4 Ultrarövid impulzusú titán-zafír szilárdtest lézer és ytterbium optikai szállézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata

4.4.1 A fotokémiai károsodások azonosítása

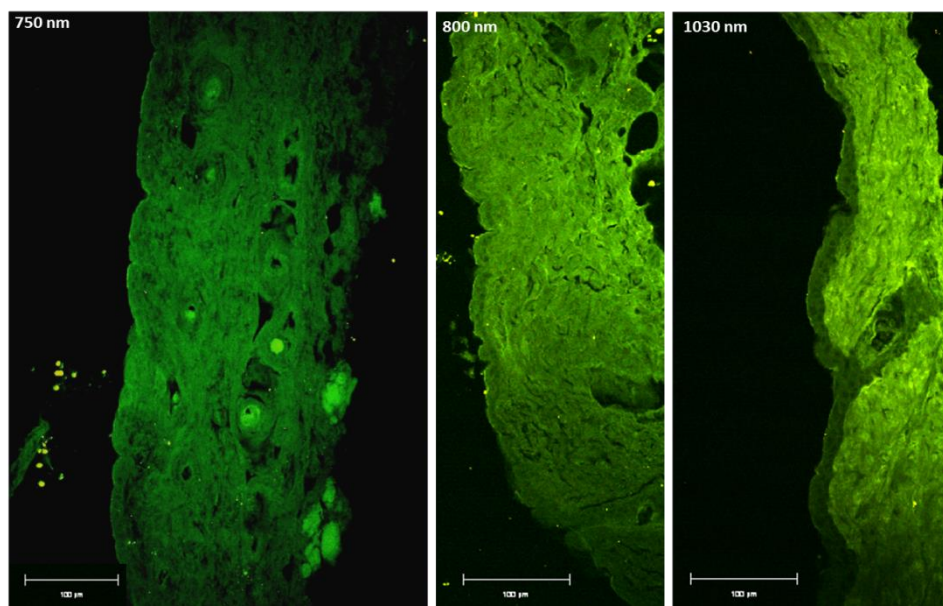
A 750 nm-es hullámhossz a mitokondriumban található NADH gerjesztési optimuma, ezáltal a sejtek citoplazmája ad fluoreszcens jelet, így azok egyszerűen azonosíthatók. Az közelinfravörös tartományon belül az alacsonyabb hullámhosszak (700 nm-780 nm) a DNS háromfotonos gerjesztéséhez ($260 \text{ nm} \times 3 = 780 \text{ nm}$) közel lehetnek, ami biztonságtechnikai problémákat vethet fel.

Eredményeink értékelése során – várakozásainkkal ellentétben – 60 mW teljesítmény és 750 nm hullámhossz alkalmazása mellett csak igen csekély CPD-pozitivitást tapasztaltunk (30. ábra), alacsonyabb teljesítmény és azonos hullámhossz esetében pedig a minta CPD-negatív volt (31. ábra/750nm).



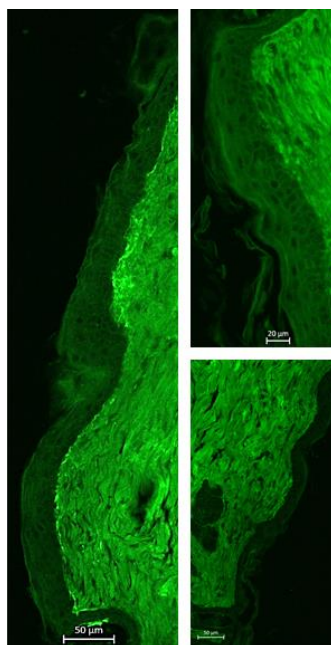
30. ábra A TiS lézer fényforrás okozta DNS károsodások azonosítása. A DNS-ben keletkező CPD-ket immunfluoreszcens jelölési technikával tettük láthatóvá. A 750 nm hullámhossz és 60 mW teljesítmény használata mellett csak néhány, gyengén festődő sejtet tudtunk azonosítani (nyilak).

A 800 nm és 1030 nm-rel irradiált minták szintén CPD-negatívak voltak (31. ábra). Ezek az eredmények ellentmondanak az irodalomban megjelent munkáknak, annak ellenére, hogy ugyanolyan mérési beállításokat használtunk. Azt azonban már korábban is említettük, hogy ezekben a publikációkban közölt eredményekkel szemben több óvatos kritika is megfogalmazható.



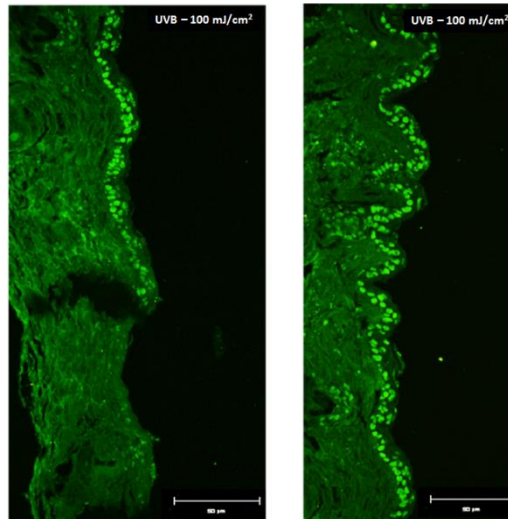
31. ábra A Ti:S lézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata. 750 nm és 25 mW teljesítmény mellett nem okoztunk károsodást a sejtek DNS-ében, a minta CPD negatív volt. 800 nm és 1030 nm-rel levilágított minták szintén CPD negatívak voltak.

A *FiberScope* működési paramétereivel megegyező, Yb szállézerrel irradiált minta a várakozásainknak megfelelően CPD-negatív volt, köszönhetően az alacsony teljesítménynek és a hosszabb, 1030 nm-es hullámhossznak (32. ábra).



32. ábra Az Yb szállézerrel kereszt irányban levilágított, CPD-negatív minta.

Kiértékelés során minden mérési sorozathoz pozitív kontrollt is beállítottunk, melyekben a CPD pozitív sejtek egyértelműen detektálhatók voltak (33. ábra). Az immunfluoreszcens jelölés specifikusságát elsődleges antitest kontrollal is ellenőriztük, melyek minden esetben negatívak voltak.

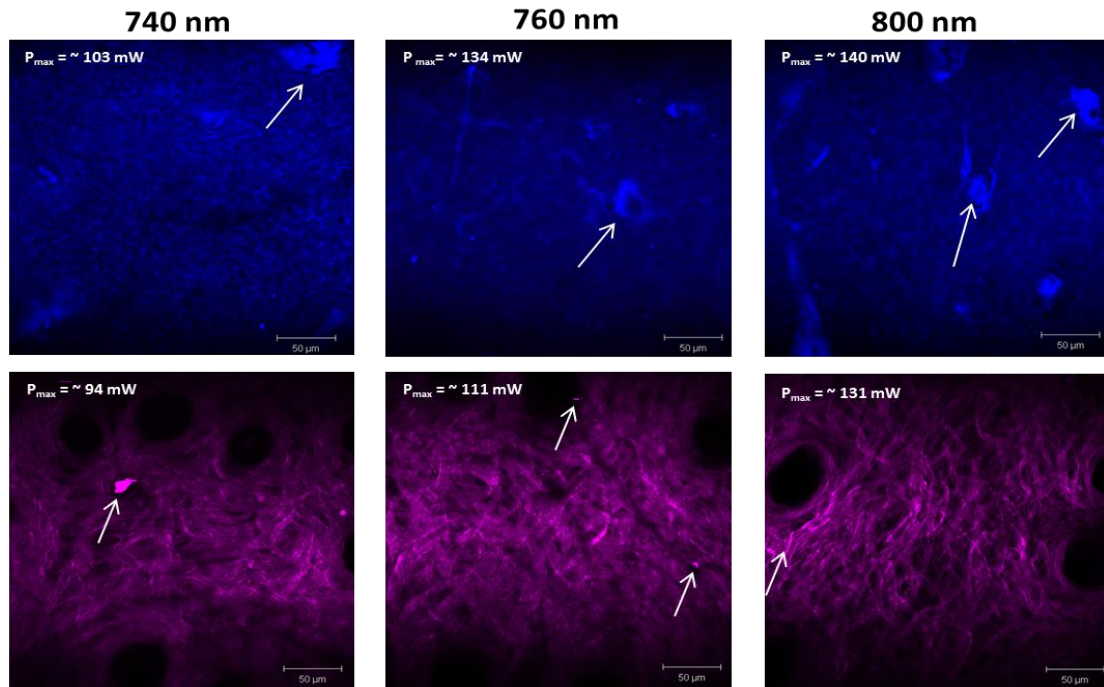


33. ábra UVB fényforrással levilágított egér hátbőr immunfluoreszcens jelölése. 100 mJ/cm² dózis az epidermális sejtek DNS-ében igen markáns CPD-pozitivitást mutat.

Összefoglalva, az új készülék tervezésénél kiemelt figyelmet fordítottunk a biztonságtechnikai vizsgálatok elvégzésére, hiszen alapvető követelmény, hogy lézer fényforrással történő vizsgálat ne okozzon maradandó károsodást a bőrben. Ebben a részfejezetben a fotokémiai károsodások detektálására fókuszáltunk, mely az intracelluláris kromofórok kétfoton excitációja következtében alakulhat ki. Az UVB sugárzás okozta károsodásokhoz hasonlóan, a DNS-ben CPD-k képződnek, melyeket immunfluoreszcens jelölési technikával azonosítottunk. Eredményeink értékelése során a CPD-pozitív sejteket rövidebb hullámhossz és viszonylag nagyobb \rightarrow 50 mW – teljesítmény mellett detektáltunk Ti:S szilárdtest lézer esetében, melynek mennyisége és intenzitása a pozitív kontrollhoz képest elhanyagolható volt. A hosszabb hullámhosszak használata – várakozásainknak megfelelően – nem okozott DNS károsodást.

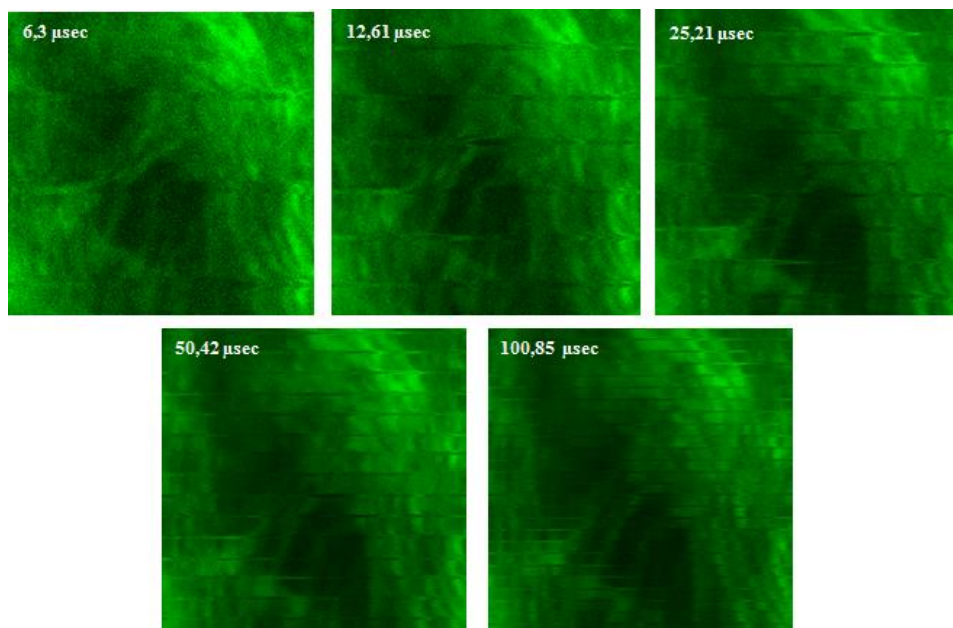
4.4.2 Termikus károsodás vizsgálata

740 nm, 760 nm és 800 nm hullámhossz esetében elmondható, hogy a bőr *in vivo* vizsgálatához képest csak extrém nagy, kb. 100-140 mW teljesítmények mellett detektáltunk termikus károsodást a különböző mélységekben (34. ábra).



34. ábra Termikus károsodások azonosítása az epidermisz-dermisz határán, illetve a dermisz mélységében *in vivo* kétfoton mikroszkóppal. Felső sor: epidermisz-dermisz határ, alsó sor: dermisz rétege, nyilak: a termikus károsodást jelző túlexponált területek

Yb szállezer esetében az alacsony teljesítmény miatt kis területről készítettünk felvételek, 6,3 μsec, 12,61 μsec, 25,21 μsec, 50,42 μsec pixel dwell time-ok mellett. Eredményeink azt mutatták, hogy ilyen alacsony teljesítmény használatával nem történik kavitáció a vizsgált mintában (35. ábra).



35. ábra Termikus károsodások indukálása a dermisz rétegében, növekvő pixel dwell time-ok mellett. Ilyen beállítók mellett nem történt kavitáció.

Eredményeink azt mutatták, hogy a megfelelő beállítások mellett az általunk használt Ti:S szilárdtest és Yb szállezer fényforrások nem okoznak sem fotokémiai, sem termikus károsodást a bőrben, így a jövőben biztonságosan alkalmazhatók *in vivo* vizsgálatokra.

5. Megbeszélés

Munkánk során a nemlineáris képalkotó módszerek alkalmazási lehetőségeit vizsgáltunk a bőrgyógyászatban. Kísérleteink első felében olyan egyszerű jelenségeket tanulmányoztunk, melyek háttérét molekuláris biológiai és biokémiai módszerek segítségével már kellő részletességgel megismerhettünk, de a bőrben zajló folyamatokat *in vivo* képalkotó technikákkal még nem követtük nyomon. Elsőként egy projekt elemeként Alexa546-jelölt DermaVir nanomedicina *in vivo* penetrációját és immunsejtek általi felvételét Langerin-EGFP-DTR *knock in* egerek bőrén. Ezt követően két hosszú távú egereken végzett kísérletet végeztünk, ahol egereken tanulmányoztuk a genetikai és diéta-indukált elhízás hatásait a dermális kollagén, valamint a szubkután zsírsejtek szerkezeti változásaira *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel.

A humán vizsgálatokhoz szükséges etikai engedélyek beszerzéséhez az általunk használt Ti:S szilárdtest és Yb szállézer fényforrások biztonságtechnikai vizsgálatait is elvégeztük, hogy meggyőződjünk arról, nem okozunk sem fotokémiai sem termikus károsodást a bőrben, igaz ennek kockázata igen alacsony.

5.1 Nanomedicinák bőrön történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

Munkánk során Alexa546 festékjelölt nanomedicinák penetrációját és kolokalizációját vizsgáltuk Langerin-EGFP-DTR *knock in* egereken *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával. Egy korábbi kísérletben hagyományos Zeiss kétfoton mikroszkóppal már sikerült nyomon követni a nanorészecskék penetrációját, valamint a bőrben lévő Langerhans sejtek általi felvételét [47]. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a CARS módszer segítségével azonosíthatók-e úgy a nanorészecskék, hogy nincsenek festékjelöléssel ellátva illetve a jövőben használni kívánt ytterbium szállézerrel működő *FiberScope* készülék milyen hatásokkal képes detektálni a festék-jelölt nanomedicinákat *in vivo*. A festékjelölés-mentes DermaVir részecskék bőrbe juttatása során a mérés szelektivitását jelentősen befolyásolta a bőrben lévő lipidek és egyéb lipid-tartalmú komponensek CARS jele, így a nanorészecskéket nem tudtuk

egyértelműen elkülöníteni. Sikeres detektálása esetén a mérés gyakorlat jelentősége a jövőben az lehet, hogy CARS módszerrel egyes molekulák saját rezgési spektrumuk alapján azonosíthatók, nem kell fluoreszcens festékkijelöléssel ellátni, illetve arra sincs szükség, hogy természetese fluoreszcenciával rendelkezzenek. Ez a technika ebben az esetben azért lehetne jelentős, mert humán vizsgálatokban a gyakran toxikus tulajdonságokkal rendelkező fluoreszcens festékek alkalmazása nem engedélyezett, így azonban a festékkijelölés-mentes nanomedicinák sikeres detektálása nagy előrelépést jelenthetne a különböző gyógyszer-molekulák bőrben történő penetrációjának *in vivo* vizsgálatában. Annak érdekében, hogy a nanomedicinákat pontosan detektálni tudjuk érdemes olyan rezgési spektrummal rendelkező molekulát választani, mely nem fed át a bőr Raman spektrumával.

A további mérések során a *FiberScope* ytterbium szállézerrel működő képalkotó eszköz segítségével ismét sikeresen kimutattuk, hogy a DermaPrep-pel kezelt bőrben lévő Langerhans sejtek egy óra elteltével felveszik az Alexa546-jelölt nanorészecskéket, és kirajzolják a bőrben lévő immunsejteket a készülék „piros” csatornáján.

A nanopartikulumok nemlineáris mikroszkópiai vizsgálatairól már 2006-ban közöltek eredményeket. König és munkatársai *ex vivo* humán bőrmintán vizsgálták a fluoreszcein izotiocinát-jelölt poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) 200 nm nagyságú nanorészecskék penetrációját. Eredményeik azt mutatták, hogy a PLGA nanopartikulumok nem képesek a stratum corneumon keresztül a mélyebb rétegekbe hatolni, hanem a felszínen, vagy az epidermisz hasadékaiban, gyűrődéseiben akkumulálódnak. Ezzel az egyszerű kísérlettel azonban azt is bizonyították, hogy a nemlineáris mikroszkópiai módszerek alkalmasak a különböző gyógyszerkészítmények *in situ* nyomon követésére és esetleges terápiás hatásuk monitorozására [106]. Bőrünk barrierjét alkotó komplex lipid-protein struktúra a különböző gyógyszerkészítmények bőrbe történő juttatásakor a legjelentősebb akadályt képezik [107]. A penetráció hatékonyságának javítása érdekében az elmúlt 30 évben került előtérbe a gyógyszer-molekulák lipid réteggel történő körbevétele azaz lipid vezikulumok létrehozása [108, 109]. Ezek mellett a polimer bázisú nanopartikulumok alkalmazása is ígéretes lehet, hiszen a polimerek hosszú, ismétlődő CH₂ kötése alkalmassá teszik CARS mikroszkópiás vizsgálatokra, festékkijelölés nélkül [110]. A cink-oxid (ZnO) nanopartikulumok (NPs) a kozmetikai és napfényvédő készítményekben széles körben

használt összetevő. Gyakori alkalmazása ellenére a ZnO formulák potenciális káros hatásairól – mint például a szabadgyök termelés által okozott DNS károsodás – máig ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésünkre [111-113]. 2013-ban Graf és munkatársai sikeresen bebizonyították *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával, hogy a ZnO NPs biztonságosan alkalmazhatók. Kísérletükben GFP-vel jelölt csontvelő átültetett egereket használtak (GFP-BM), így a csontvelő eredetű összes immunsejt, mint például a makrofágok, neutrofil granulociták, Langerhans sejtek vagy a limfociták a GFP jelölésnek köszönhetően a mikroszkóp zöld csatornájában voltak azonosíthatók. Pozitív kontrollként az egerek fülét lipopoliszacharid oldattal kezelték, mely egy határozott immunreakciót váltott ki, ez a fluoreszcens immunsejtek számának növekedésével járt. Hasonlóan végezték méréseiket ZnO ~35 nm-es méretű nanopartikulum szuszpenzióval, és eredményeik azt mutatták, hogy sem az epidermiszben, sem a dermiszben nem okozott immunválaszt az anyag, ugyanakkor ismét megbizonyosodhattunk arról, hogy a nemlineáris optikai módszerek a jövőben alkalmassá válhatnak a különböző nanomedicinák *in vivo* követésére [114].

5.2 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken

A vizsgálat kezdetekor a leptin deficiens egerek (ob/ob-ND, ob/ob-KRD) 8 hetesen a kontroll egerek tömegének másfélszeresét mutatták. A 4. héten a normál diétán tartott ob/ob csoport tömege közel 50 g volt, míg azoknál a szintén leptin deficiens egereknél, melyek csak korlátozott mennyiségben kapták a takarmányt enyhe súlycsökkenést tapasztaltunk. A kísérlet végére a normál diétán tartott csoport (ob/ob-ND) tömege közel háromszorosára gyarapodott a másik két csoporthoz képest (ob/ob-KRD, kontroll). Az extrém magas tömeg ebben a csoportban a dermális kollagén fragmentálódását és degradációját okozta, ezáltal az SHG intenzitás csökkenését, valamint a dermisz elvékonyodását is. A kalória restrikción tartott leptin deficiens egerek (ob/ob-KRD) tömege a kontroll állatokéval hasonló értéket mutatott és a 30 hét alatt jelentősen nem változott. A kollagén szerkezete ennek köszönhetően megtartotta rostós, szabályos szerkezetét. Ez a jelenség azt bizonyítja, hogy a kötőszöveti változásokért nem a genetikai háttér felelős, hanem az elhízás okozta metabolikus és

anyagcsere változások. A dermális kollagén morfológiai változása mellett a szubkután zsírsejtek kiterjedését is vizsgáltuk az ob/ob-ND és kontroll csoportban, *ex vivo* CARS módszerrel. Várakozásainknak megfelelően az elhízott állatok adipocitái szemmel láthatóan nagyobb méretűek voltak a kontroll állatokhoz képest. Hosszú távú kísérletünk jelentősége, hogy elsőként követtünk nyomon az elhízás okozta kötőszöveti változásokat SHG módszerrel *in vivo* állatmodellen vizsgálva, továbbá a képalkotó mérőrendszer fejlesztésében is előrelépést jelentett az Yb szállézeren alapuló CARS egység használata. Ezure és Amano már 2010-ben megfigyelték, hogy a magas zsírtartalmú diétán tartott egerek bőrének rugalmassága csökken, a szubkután réteg megvastagodása a dermisz elvékonyodását és a fibroblaszt sejtek számának csökkenését okozza [79]. Egy évvel később folytatták vizsgálataikat, immár 3T3-L1 sejtenyészetben, melyek során bizonyították, hogy a megnagyobbodott adipociták gátolják a fibroblaszt sejtek proliferációját, csökkentik az I. típusú kollagén és elasztin génexpresszióját, ugyanakkor a mátrix metalloproteináz 13 expresszióját növelik. Érdekesség, hogy ezek a jelenségek nem voltak megfigyelhetők, ha normál méretű adipociták voltak jelen a sejtenyészetben. Ezt követően azt is sikerült igazolniuk, hogy a nagy méretű zsírsejtek által termelt palmitin – ami egy szabad zsírsav (FFA) – felelős a dermális kollagén degradációját okozó folyamatok elindításáért [115].

Munkánk során az elhízás okozta kötőszöveti változásokat elsőként sikerült nyomon követni *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS nemlineáris mikroszkópiai módszerekkel [101]. Megfigyelésink a korábbi molekuláris biológiai módszerekkel igazolt jelenségekkel összhangban voltak és bebizonyítottuk, hogy a nemlineáris képalkotó módszerek alkalmasak lehetnek a jövőben az elhízással kapcsolatos *in vivo* humán vizsgálatokra is.

5.3 Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel különböző diétán tartott C57BL/6 egereken

A vizsgálat 12. hetétől kezdve tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a különböző csoportok testtömege között. Az elhízás mértékével párhuzamosan a dermális kollagén degradációját is megfigyelhettük, *in vivo* SHG módszerrel nyomon követve, főleg a magas zsírtartalmú tápon tartott HFat csoportban, ahol az állatok

tömege majdnem duplájára gyarapodott a vizsgálat végére a kontroll csoporthoz képest. A 20% fruktóz tartalmú ivóvíz a csoport egyedeinél nem okozott látványos elhízást, de a kollagén degradációja szemmel láthatóvá vált a vizsgálat végére. Érdekesség, hogy a HFHF csoportnál az egészségtelen „nyugati” típusú diéta – a várakozásainkkal ellentétben – nem okozott drámai változást sem a testtömegben, sem a kollagén szerkezetében. Ezt a jelenséget a saját megfigyeléseinkkel próbáljuk értelmezni. Az első szembetűnő különbség, hogy a csoport egyedeinek takarmány és folyadék fogyasztása jóval alacsonyabb volt a HFru és HFat csoporthoz viszonyítva. Ennek talán az lehet az oka, hogy a 20% fruktóz tartalmú ivóvíz csökkentette az étvágyat, a két, különböző típusú diéta úgymond kiegészíti egymást. A HFru csoportban magas volt a vízfogyasztás és a takarmány fogyása moderáltabb, míg a HFat csoportnál fordítva, a takarmány fogyott gyorsabban az ivóvízhez képest. Így ha a két diétát együtt alkalmaztuk, mind az ivóvízből, mind a takarmányból csak mérsékelt fogyasztás történt, emiatt valószínűsítjük, hogy nem történt drasztikus elhízás, illetve a szöveti glikáció mértéke sem lehetett jelentős. Az alábbi jelenségek hatásait az *in vivo* SHG felvételeink és a szövettani eredményeink is igazolják. Eredményeink alapján továbbá azt is megállapíthattuk, hogy a nemlineáris mikroszkópiai módszerek, mint például az *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszer megfelelő képalkotó technika az elhízás és a szöveti glikáció okozta kötőszöveti változások nyomon követésére. A mikroszkópiás rendszernek azonban korlátai is vannak: rágsálók esetén is hasonló módon zajlik a szőrnövekedési ciklus, mint az embernél. Az anagén, aktív fázisban a melanin termelése fokozott, mely erős fényszóró és abszorbeáló képessége miatt a lézerefény behatolását csökkenti, az aktív szőrnövekedés miatt pedig a szőrtelenítés is kevésbé hatékony. Ezek eredményeként a felvételek képminősége romlik. A zsírsejtek vizualizációjára alkalmas CARS módszert, az előző munkánkban ismertetett okok miatt, csak *ex vivo* minták vizsgálatára tudtuk alkalmazni, ezért használtuk a kísérlet utolsó mérési időpontjában.

A zsírszövet funkciójával kapcsolatos ismeretek sokat gyarapodtak az elmúlt húsz évben. Ma már tudjuk, hogy a zsírsejtek endokrin funkciókat látnak el az adipokinek termelésén keresztül, emellett részt vesznek gyulladásos és infektív folyamatokban, valamint a karcinogenezisben [67, 68]. Obezitás esetén az adipokinek szintje emelkedett, melyek különböző szignál transzdukciós útvonalakat képesek aktiválni – mint például PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT –, melyek kedveznek a

daganatos sejtek növekedésének, proliferációjának és progressziójának [116]. Bőrgyógyászati szempontból a melanoma malignum és az obezitás közti összefüggésekről jelentek meg irányadó publikációk. Brandon és munkatársai 2009-ben megjelent közleményükben hívták fel a figyelmet a leptin szerepére a melanoma növekedésében. Kísérletükben leptin deficiens egereket vizsgáltak normál és kalória restriktív diétán tartva. Az állatok bőre alá B16F10 melanoma sejteket injektáltak, majd követték a tumor növekedését 17 napon keresztül. Eredményeik azt mutatták, hogy az elhízás kedvez a tumor növekedésének, míg a kalória restriktív tartott egerek tumorai kisebb méretűek voltak [117]. Hasonló publikációban Malvi és munkatársai is a testsúly kontroll jelentőségét hangsúlyozzák, mely szerintük a melanoma megelőzésében kulcsfontosságú. Elhízás következtében a megváltozott mikrokörnyezet, mint például a gyulladásos citokinek vagy a szérumban lipidek emelkedett szintje, kedvező feltételeket biztosít a tumoros sejtek proliferációjának. A testsúly szabályozása visszaállítja az adipokinek megfelelő szintjét, ezáltal csökken a tumorok mérete, és növekedésük is lassul [118]. Érdekes, hogy a humán vizsgálatok nem támasztották alá ezeket az összefüggéseket. 2012-ben Pothiwala és munkatársai által publikált tanulmányban a BMI index valamint a melanoma, spinocelluláris karcinoma és a basalioma előfordulási gyakoriságát vizsgálták. Eredményeik azt mutatták, hogy a tumorok és az obezitás között inverz összefüggés van, tehát az elhízott egyének között ritkábban fordulnak elő bőrtumorok. Ezt egyszerű, magatartásbeli különbségekkel magyarázták. Az elhízásért felelős egyik elsődleges faktor a fizikai inaktivitás, míg a tumorok kialakulásának hátterében a krónikus UV sugárzás áll. A mozgásszegény életmódot folytató emberek kevesebb időt tartózkodnak a szabadban, így kevésbé vannak kitéve a napfény káros hatásainak. Ugyanakkor azt is leszögezik, hogy a túlsúly okozta krónikus gyulladás súlyosbíthatja az UVB okozta gyulladásos reakciókat is, ami kedvező körülményeket biztosít a karcinogenezisnek [119]. Qi és munkatársai 2014-ben megjelent metaanalízisükben szintén nem találtak kapcsolatot az elhízás és a melanoma gyakorisága között. Szerintük az elhízás és a 2. típusú diabétesz a melanoma kialakulásában, mint független kockázati faktor szerepelhet, közvetlen hatása a tumor képződésére nincs [120]. Az irodalomban szereplő ellentmondásos eredmények is bizonyítják az elhízás és a melanoma kapcsolatának komplexitását, további vizsgálatok szükségesek az esetleges közös patofiziológiai útvonalak feltérképezésére.

5.4 Ultrarövid impulzusú titán-zafír szilárdtest lézer és ytterbium optikai szállézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata

Eredményeink azt mutatták, hogy 750 nm hullámhosszra hangolt és 60 mW teljesítményre állított Ti:S lézerrel irradiált mintán csak csekély CPD-pozitivitás tapasztalható [121]. 800 nm és 1030 nm alkalmazása esetén a minták CPD-negatívak voltak, hasonlóan az Yb szállézerrel besugarazott mintákhoz. Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a nemlineáris mikroszkópiában alkalmazott impulzus üzemi femtoszekundumos lézer fényforrások nem okoznak maradandó károsodást a bőrben, *in vivo* alkalmazásuk biztonságos. 2013-ban Giju és mtsai egy módosított „cancer risk model” segítségével becsülték meg a nemlineáris mikroszkópokban használt Ti:S szilárdtest lézer DNS károsító hatását hörcsög ovárium (CHO) sejttenyészetben 711, 750 és 780 nm hullámhosszon [122]. A kockázati modell alapján kiértékelt eredmények azt mutatták, hogy ha valaki például 30 éves korában esik át egy évben egy alkalommal *in vivo* nemlineáris mikroszkópiai vizsgálaton, akkor mindössze 0,00061%-kal nő a laphámrák kialakulásának esélye. Ha a legextrémebb példát vesszük – ami 40 vizsgálatot jelent évente – 80 éves egyénen a legkritikusabb, 711 nm hullámhosszon és 500 J/m² dózissal, a laphámrák kialakulásának esélye még ekkor is csak 0,035%-kal nő. A publikáció konklúziója a mi eredményeinkhez hasonlóan azt állítja, hogy az *in vivo* nemlineáris mikroszkópiai módszerek DNS károsító hatása elhanyagolható a napfény okozta DNS léziók mennyiségéhez képest. A tanulmányban használt kockázati modellnek azonban korlátai is vannak: csak a laphámrák becslésére alkalmas, annak ellenére, hogy az UV sugárzásnak bizonyított szerepe van a bazálsejtes karcinóma és a melanoma malignum kialakulásában is [123, 124]. Ezen karcinómák hátterében azonban genetikai és további környezeti faktorok is állhatnak, ezáltal kialakulásuk komplexebb. A kockázati modell főleg a Kaukázusi rasszt érinti, tehát a Fitzpatrick I-III bőrtípust, akik érzékenyebbek az UV okozta bőrtumorokra. A IV-VI bőrtípusba tartozó egyének a nagyobb mennyiségű melanin miatt védettebbek a napsugárzással szemben, a melanin erős abszorbeáló tulajdonsága miatt nagyobb teljesítményt kellene alkalmazni egy *in vivo* vizsgálathoz, ami a kockázati modell eredményét módosítaná. A szerzők csak a CPD-k kialakulását vizsgálták, az UVA okozta bázismódosulásokat (8oxoGua), DNS egyszálú illetve kétszálú töréseket figyelmen kívül hagyták. A kockázati modell

csak a bőrben okozott károsodások megítélésére alkalmas, holott a nemlineáris mikroszkópiának a jövőben potenciális szerepe lehet a belső szervek képalkotásában is. Mivel a belső szervek UV-vel történő sugarazása nem gyakori módszer, ezért a belső szervek UV-okozta tumor képződéséről epidemiológiai adatok nincsenek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a belső szervek sejtjei sokkal érzékenyebbek, illetve a repair mechanizmusuk kevésbé hatékony az UVR okozta DNS károsodások kijavítására. Ugyanakkor ez utóbbiak repair folyamataik hatékonyságának vizsgálata érdekes lehetne UV és fs lézerek besugarazását követően megvizsgálni.

A termikus károsodások értékelése során megállapíthattuk, hogy a vizsgált mintákon különböző mélységekben csak extrém nagy teljesítmények alkalmazásakor tapasztalhatunk kavitációt. Ti:S lézer fényforrást használva, 740 nm hullámhossz esetében az epidermisz-dermisz határán 130 mW, a dermiszben 94 mW mintára eső teljesítmény mellett tapasztaltunk termikus károsodást. Hasonló értéket kaptunk 760 nm és 780 nm hullámhossz esetében is: EDJ – 134 mW, dermis – 111 mW, EDJ – 140 mW, dermisz – 131 mW. Az infravörös tartományban működő Yb szállézer alacsony átlagteljesítménye miatt (6 mW) nem okozott kavitációt a vizsgált mintákban. A bőr *in vivo* vizsgálatához Ti:S lézer esetében jellemzően 25-50 mW teljesítményt használnak, az Yb szállézer pedig a hosszabb hullámhossznak köszönhetően már 5-8 mW teljesítményen képes a megfelelő felvételek elkészítésére, kavitáció okozása nélkül.

Összefoglalva a nemlineáris mikroszkópokban használatos impulzus üzemi, hangolható, femtoszekundumos lézer fényforrások a megfelelő beállítások mellett sem fotokémiai sem termikus károsodást nem okoznak a bőrben, ezért az *in vivo* képalkotás biztonságosan végrehajtható.

6. Következtetések

- A transzkután immunizáció egy biztonságos, nem invazív antigén bejuttatást tesz lehetővé az epidermiszen keresztül. A módszernek azonban gátat szabhat bőrünk barrierje, mely az antigének penetrációját akadályozhatja, manapság azonban már számos stratégia került kidolgozásra mely az immunizáció hatékonyságát növeli. Munkánk során a velünk kollaboráló munkacsoport által használt Alexa546 festékjelölt DermaVir nanopartikulumok penetrációját és immunsejtek általi felvételét vizsgáltuk Langerin-EGFP-DTR *knock in* egerek bőrében DermaPrep kezelést követően *in vivo* CARS módszerrel, majd a *FiberScope* készülékkel. Egy korábbi közleményben ezt a jelenséget sikeresen detektálni tudták *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával. A CARS módszer segítségével úgy gondoltuk, hogy a festékjelölés-mentes DermaVir oldat PEIm komponense nagy hatásfokkal gerjeszthető, így a nanomedicina önmagában azonosíthatóvá válik. A mérések során azonban a bőrben jelen lévő intracelluláris lipidek és egy egyéb lipid-tartalmú komponensek CARS jele egy erős háttérrel eredményezett, így a nanopartikulumokból származó fluoreszcens jel nem volt egyértelműen elkülöníthető a többi alkotóelemtől. A nanomedicinák *in vivo* festék jelölés-mentes azonosítása a bőrben a jelentős előrelépést hozna a humán vizsgálatokban, hiszen a gyakran toxikus tulajdonságokkal rendelkező fluoreszcens festékek alkalmazása humán célokra nem engedélyezett. Ilyen esetekben érdemes olyan molekulaszervezetű nanomedicinát választani melynek Raman spektruma távolabb esik bőr Raman spektrumától, így azok egyszerűen detektálhatók. A szállézer fényforrással működő *FiberScope* készülékkel azonban sikeresen azonosítani tudtuk a festékjelölt DermaVir részecskéket amint 1 óra elteltével kirajzolják a bőrben lévő Langerhans sejteket. Ezzel a kísérlettel a készülék használhatóságát szerettük volna demonstrálni és megállapíthattuk, hogy a jövőben hatékonyan alkalmazható állatkísérletekben a különböző festékjelölt nanomedicinák penetrációjának *in vivo* követésére.

- Az elhízás és a 2-es típusú cukorbetegség gyakorisága világszerte növekszik, számos krónikus betegség mellett dermatológiai kórképek kialakulásáért is felelőssé tehető. Ezek mellett a dermatológiai kórképek előfordulása is jelentős. Az elhízás során a megnagyobbodott zsírsejtek a dermális kollagén degradációját okozzák, melyet korábban invazív, molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel már bizonyítottak. Munkánk során leptin deficiens és vad típusú egerek bőrének kötőszöveti változásait követtük nyomon *in vivo* SHG módszerrel, négy mérési időpontban, valamint a kísérlet végén a zsírsejtek méretbeli változásait vizualizáltuk *ex vivo* CARS technikával. Az állatok tömegének növekedésével párhuzamosan csökkent a dermális kollagén mennyisége, ezáltal alacsonyabb SHG intenzitásokat mértünk. Az adipociták méretei között pedig szemmel látható különbségeket tapasztaltunk a különböző egércsoportokban. Ezt a nagy érzékenységgű, a zsírsejtek festékkjelölés nélküli képalkotását lehetővé tevő CARS mérőrendszerrel készített nagy felbontású felvételek alapján tudtuk megállapítani. A CARS mikroszkópiás mérések megerősítették, hogy az elhízott állatok adipocita sejtjei jelentősen nagyobb kiterjedésűek voltak a kontrollhoz képest, és a dermisz felé nyomulva feltételezhetően hozzájárulhattak az extracelluláris mátrix degradációjához, melynek következtében a dermisz elvékonyodott. Ezt a jelenséget a szövettani kiértékelés is megerősítette. Munkánk során sikerült igazolnunk, hogy a nemlineáris képalkotó módszerek, mint például az SHG vagy a CARS megfelelően alkalmazhatók a metabolikus szindróma által okozott elváltozások azonosítására, ez a jövőben lehetőséget teremt egy olyan, non-invazív diagnosztikai célra alkalmas képalkotó eszköz megalkotására, ami a praktizáló orvosnak segítségére lehet a diabétesszel járó dermatológiai kórképek korai felismerésében.
- A humán elhízás és egészségtelen táplálkozás hitelesebb modellezése céljából az nem genetikailag módosított egereket használtunk, hanem vad típusú C57BL/6 egereket tartottunk magas zsír- és/vagy cukortartalmú diétán. Az előző kísérlethez hasonlóan az elhízás ismét a kollagén fragmentációját, valamint a dermisz elvékonyodását okozta, különösen a magas zsírtartalmú takarmányon

tartott csoportban. A magas fruktóztartalmú ivóvizet fogyasztó csoport egyedénél nem tapasztaltunk szignifikáns súlygyarapodást a kontroll csoporthoz képest, de a kollagén degradációja szemmel látható volt, amit a szövettani eredmények is alátámasztottak. Annál a csoportnál, ahol az egerek mindkét „egészségtelen diétának” ki voltak téve (HFHF) a legmarkánsabb változásokat vártuk. Úgy gondoltuk, hogy az elhízás és a szöveti glikáció együttes hatása károsítja legjobban a kötőszöveti struktúrát, ennek ellenére sem a testtömegben, sem a kollagén degradációjában nem tapasztaltunk drámai változásokat. Azt azonban kiemelnénk, hogy a kontroll csoporthoz képest itt is szignifikánsan nőtt a testtömeg, az adipociták mérete, és ezzel párhuzamosan csökkent a kollagén mennyisége, de a dermisz vastagsága nem csökkent jelentősen. Kísérletünkben ismét bebizonyítottuk, hogy a nemlineáris mikroszkópiai módszerek alkalmasak a kötőszöveti változások nyomon követésére *in vivo* és *ex vivo* egyaránt. Eredményeink továbbá felhívják a figyelmet a megfelelő táplálkozás és testsúly kontroll fontosságára is.

- Munkánk során arra is figyelmet fordítottunk, hogy a nemlineáris mikroszkópokban használt impulzus üzemű lézer fényforrások biztonságtechnikai kockázatait felmérjük. Vizsgálataink során különböző lézer beállítások mellett egér hátbőrt exponáltunk *in vivo*. Eredményeink kiértékelése során csak magas teljesítmények mellett (60 mW) tapasztaltunk csekély CPD-pozitivitást a vizsgált mintákon, melyek mennyisége és intenzitása az UVB-vel besugározott pozitív kontrollhoz képest elhanyagolható volt. Termikus károsodást szintén csak nagyon magas teljesítmények mellett tudtunk produkálni (100-110 mW). A humán bőr *in vivo* vizsgálatához tipikusan 25-50 mW teljesítmény szükséges, Yb szállézer esetében ennél alacsonyabb teljesítmény is elegendő a hosszabb 1030 nm-es hullámhossz miatt. Ebben a részfeladatban bebizonyítottuk, hogy a nemlineáris mikroszkópok lézer fényforrásai biztonságos képalkotást tesznek lehetővé *in vivo* mérési körülmények között, melyeket már korábbi publikációkban is megerősítettek.

7. Összefoglalás

Az utóbbi évek jelentős áttörést hoztak a nemlineáris 3D-s mikroszkópia bőrgyógyászatban történő kutatási és klinikai alkalmazása területén. A nemlineáris optikai folyamatok között számos olyan módszer került kidolgozásra, mely alkalmas a bőr *in vivo* vizsgálatára, ilyen például a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (TPEF), a másodharmonikus keltés (SHG), vagy a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS). A bőrben található természetes kromofórok közel-infravörös hullámhossz tartományban (700-1300 nm) történő gerjesztése biztonságos, jelölés nélküli képalkotást tesz lehetővé nagy térbeli és időbeli felbontás mellett.

Munkánk során *in vivo* állatkísérleteket terveztünk, melyek során olyan jelenségeket vizsgáltunk, melyek a klinikumban is gyakran előfordulnak, és sok pácienset érintenek. Ilyen például a nanopartikulumok penetrációjának vizsgálata, vagy a kötőszöveti rostok elhízás okozta strukturális változásainak, illetve a szubkután zsírszövetek megnagyobbodásának nyomon követése különböző nemlineáris optikai képalkotó módszerek segítségével. A továbbiakban a nemlineáris mikroszkópokban használt impulzus üzemű femtoszekundumos lézer fényforrások biztonságtechnikai kockázatait is felmértük. Az endogén kromofórok kétfoton excitációja az UVB sugárzáshoz hasonlóan a DNS-ben ciklobután pirimidin dimerek kialakulásához vezethet. Eredményeink azonban azt mutatták, – az irodalomban megjelent eredmények többségével összhangban – hogy a különböző lézer fényforrások biztonságos képalkotást tesznek lehetővé.

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a nemlineáris mikroszkópia a közeljövőben egy új képalkotó eszközzé válhat a bőrgyógyászatban. Úgy gondoljuk a technika segítségével egyes betegségek egyértelműen azonosíthatók, így a patológiai vizsgálatokat megfelelően kiegészítheti, esetleg helyettesítheti is, valamint objektív módszerré válhat a különböző terápiák hatásosságának követésében is.

Munkacsoportunk további célja, több hazai kutatócsoporttal együttműködve, egy kisméretű, kevésbé költséges, lézerpasztázó mikroszkóp megtervezése, mely a bőrgyógyászok mindennapi munkáját segítheti. A disszertációban bemutatott eredmények az imént ismertetett képalkotó eszköz tervezéséhez és megépítéséhez szükséges alapadatokat szolgáltatják.

Summary

In recent years a significant breakthrough was achieved in non-linear 3D microscopic techniques used in clinical and experimental dermatology.

Numerous nonlinear optical methods have been developed lately that are suitable for *in vivo* imaging of the skin, such as two-photon excitation fluorescence (TPEF), second harmonic generation (SHG) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS). Each layer of the skin contains several endogenous chromophores that can be excited in the spectral range of 700-1300 nm, which allows a safe and label-free imaging with high spatial and temporal resolution.

During our experiments we examined the possible application of nonlinear optical techniques in dermatology. In our first part we planned *in vivo* animal studies to investigate skin structure alterations that often occur in daily clinical practice and may affect many patients. Most relevant of these are the penetration of nanomedicines, the effect of obesity on structural changes of dermal collagen and imaging of adipocyte sizes by using various nonlinear optical techniques. Further we assessed the potential health risks of the pulsed laser beam used in the nonlinear microscope. Two-photon excitation of endogenous chromophores, similarly to UVB radiation, may lead to cyclobutane pyrimidine dimer formation in the DNA. However, our results showed that various laser light sources allowed a safe imaging without any damaging effects.

These experiments showed that nonlinear microscopy is a useful tool with great potential in dermatology. We believe that by using these methods structural changes behind skin diseases will be easy to identify thus it can complement or even replace the histological examinations. In addition, we believe that nonlinear imaging techniques are suitable for monitoring and assessing the efficacy of different therapies objectively.

Our further aim is to collaborate with other research groups to design a compact, cost effective laser scanning microscope that can be used in the dermatologist's office. The results presented in this thesis provide basic technical information, which are necessary in further construction and designing of the handheld device.

8. Irodalomjegyzék

1. Kleinerman R, Whang TB, Bard RL, Marmur ES. (2012) Ultrasound in dermatology: principles and applications. *J Am Acad Dermatol*, 67(3): p. 478-87.
2. Fernández Canedo I, de Troya Martín M, Fúnez Liébana R, Rivas Ruiz F, Blanco Eguren G, Blázquez Sánchez N. (2013) Preoperative 15-MHz ultrasound assessment of tumor thickness in malignant melanoma. *Actas Dermosifiliogr*, 104(3): p. 227-31.
3. Hinz T, Voth H, Ahmadzadehfar H, Hoeller T, Wenzel J, Bieber T, Schmid-Wendtner MH. (2013) Role of high-resolution ultrasound and PET/CT imaging for preoperative characterization of sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma. *Ultrasound Med Biol*, 39(1): p. 30-6.
4. Uren RF, Howman-Giles R, Chung D, Thompson JF. (2015) Imaging sentinel lymph nodes. *Cancer J*, 21(1): p. 25-32.
5. Rohrbach DJ, Muffoletto D, Huihui J, Saager R, Keymel K, Paquette A, Morgan J, Zeitouni N, Sunar U. (2014) Preoperative mapping of nonmelanoma skin cancer using spatial frequency domain and ultrasound imaging. *Acad Radiol*, 21(2): p. 263-70.
6. Barcaui Ede O, Carvalho AC, Valiante PM, Barcaui CB. (2014) High-frequency ultrasound associated with dermoscopy in pre-operative evaluation of basal cell carcinoma. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 89(5): p. 828-831.
7. Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S. (2013) In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application. *J Biomed Opt*, 18(6): p. 061212.
8. http://www.dermall.hu/video_player/17/konfokalis-mikroszkop---ablak-az-elo-borre.
9. Denk W, Strickler JH, Webb WW. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951): p. 73-6.
10. Göppert-Mayer M. (1931) Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annals of Physics*, 9: 273–95.
11. Kaiser W, Garrett CG. (1961) Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺. *Physical Review Letters*, 7: p. 229-231.

12. Breunig HG, Studier H, König K. (2010) Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin in vivo. *Opt Express*, 18(8): p. 7857-71.
13. Vanzi F, Sacconi L, Cicchi R, Pavone FS. (2012) Protein conformation and molecular order probed by second-harmonic-generation microscopy. *J Biomed Opt*, 17(6): p. 060901.
14. Stoothoff WH, Bacskai BJ, Hyman BT. (2008) Monitoring tau-tubulin interactions utilizing second harmonic generation in living neurons. *J Biomed Opt*, 13(6): p. 064039.
15. Liu W, Raben N, Ralston E. (2013) Quantitative evaluation of skeletal muscle defects in second harmonic generation images. *J Biomed Opt*, 18(2): p. 26005.
16. Freund I, Deutsch M, Sprecher A. (1986) Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophys J*, 50: p. 693-712.
17. Sugata K, Osanai O, Sano T, Takema Y. (2011) Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy. *Skin Res Technol*, 17(1): p. 1-3.
18. Wu S, Li H, Yang H, Zhang X, Li Z, Xu S. (2011) Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy. *J Biomed Opt*, 16(4): p. 040502.
19. El Madani HA, Tancrede-Bohin E, Bensussan A, Colonna A, Dupuy A, Bagot M, Pena AM. (2012) In vivo multiphoton imaging of human skin: assessment of topical corticosteroid-induced epidermis atrophy and depigmentation. *J Biomed Opt*, 17(2): p. 026009.
20. Puschmann S, Rahn CD, Wenck H, Gallinat S, Fischer F. (2012) Approach to quantify human dermal skin aging using multiphoton laser scanning microscopy. *J Biomed Opt*, 17(3): p. 036005.
21. Tancrede-Bohin E, Baldeweck T, Decenci re E, Brizion S, Victorin S, Parent N, Faugere J, Souverain L, Bagot M, Pena AM. (2015) Non-invasive short-term assessment of retinoids effects on human skin in vivo using multiphoton microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29(4): p. 673-81.
22. Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. (2003) Influence of cultured dermal fibroblasts on human melanoma cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and invasion in vitro. *Arch Dermatol Res*, 295(6): p. 236-41.
23. Monhian N, Jewett BS, Baker SR, Varani J. (2005) Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. *Arch Facial Plast Surg*, 7(4): p. 238-43.

24. Maker PD, Terhune RW. (1965) Study of Optical Effects Due To an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength. *Physical Review Letters*, **137**: p. 801-818.
25. Begley RF, Harvey AB, Byer RL. (1974) Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Appl Phys Lett*, 25: p. 387-390.
26. Cheng JX. (2007) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Appl Spectrosc*, 61(9): p. 197-208.
27. Potma EO, Xie XS. (2005) Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Chemphyschem*, 6(1): p. 77-9.
28. Nan X, Cheng JX, Xie XS. (2003) Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J Lipid Res*, 44(11): p. 2202-8.
29. Zimmerley M, Lin CY, Oertel DC, Marsh JM, Ward JL, Potma EO. (2009) Quantitative detection of chemical compounds in human hair with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J Biomed Opt*, 14(4): p. 044019.
30. Zhang X, Roeffaers MB, Basu S, Daniele JR, Fu D, Freudiger CW, Holtom GR, Xie XS. (2012) Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy. *Chemphyschem*, 13(4): p. 1054-9.
31. Kennedy AP, Sutcliffe J, Cheng JX. (2005) Molecular composition and orientation in myelin figures characterized by coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Langmuir*, 21(14): p. 6478-86.
32. Breunig HG, Bückle R, Kellner-Höfer M, Weinigel M, Lademann J, Sterry W, König K. (2012) Combined in vivo multiphoton and CARS imaging of healthy and disease-affected human skin. *Microsc Res Tech*, 75(4): p. 492-8.
33. Shi Y, Zhang D, Huff TB, Wang X, Shi R, Xu XM, Cheng JX. (2011) Longitudinal in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of demyelination and remyelination in injured spinal cord. *J Biomed Opt*, 16(10): p. 106012.
34. Imitola J, Côté D, Rasmussen S, Xie XS, Liu Y, Chitnis T, Sidman RL, Lin CP, Khoury SJ. (2011) Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction in multiple sclerosis-like lesions in mice. *J Biomed Opt*, 16(2): p. 021109.
35. König K, Ehlers A, Riemann I, Schenkl S, Bückle R, Kaatz M. (2007) Clinical two-photon microendoscopy. *Microsc Res Tech*, 70(5): p. 398-402.

36. Hanson KM, Bardeen CJ. (2009) Application of nonlinear optical microscopy for imaging skin. *Photochem Photobiol*, 85(1): p. 33-44.
37. Haluszka D, Lőrincz K, Csákányi A, Vass L, Krolopp Á, Kolonics A, Szipoecs R, Kárpáti S, Wikonkál N. (2015) Nemlineáris mikroszkópia alapjai és alkalmazási lehetőségei a dermatológiában. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle*, 91(1): p. 34-39.
38. Kárpáti S, Kemény L, Remenyik É. (2013) *Bőrgyógyászat és Venerológia, Medicina: Budapest.*
39. Rodrigues LM, Pinto PC, Magro JM, Fernandes M, Alves J. (2004) Exploring the influence of skin perfusion on transepidermal water loss. *Skin Res Technol*, 10(4): p. 257-62.
40. Liao YH, Chen SY, Chou SY, Wang PH, Tsai MR, Sun CK. (2013) Determination of chronological aging parameters in epidermal keratinocytes by in vivo harmonic generation microscopy. *Biomed Opt Express*, 4(1): p. 77-88.
41. Ghosh S, Kim D, So P, Blankschtein D. (2008) Visualization and quantification of skin barrier perturbation induced by surfactant-humectant systems using two-photon fluorescence microscopy. *Journal of Cosmetic Science*, 59(4): p. 263-289.
42. Bogнар P, Nemeth I, Mayer B, Haluszka D, Wikonkal N, Ostorhazi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pasztoi M, Buzas EI, Szipoecs R, Kolonics A, Temesvari E, Karpáti S. (2014) Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 134(1): p. 105-11.
43. Darvin ME, König K, Kellner-Hoefer M, Breunig HG, Wernecke W, Meinke MC, Patzelt A, Sterry W, Lademann J. (2012) Safety Assessment by Multiphoton Fluorescence/Second Harmonic Generation/Hyper-Rayleigh Scattering Tomography of ZnO Nanoparticles Used in Cosmetic Products. *Skin Pharmacology and Physiology*, 25(4): p. 219-226.
44. Leite-Silva VR, Le Lamer M, Sanchez WY, Liu DC, Sanchez WH, Morrow I, Martin D, Silva HD, Prow TW, Grice JE, Roberts MS. (2013) The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2): p. 297-308.
45. Chen X, Grégoire S, Formanek F, Galey JB, Rigneault H. (2015) Quantitative 3D molecular cutaneous absorption in human skin using label free nonlinear microscopy. *Journal of Controlled Release*, 200: p. 78-86.

46. Masters BR, So PT, Gratton E. (1997) Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophys J*, 72(6): p. 2405-12.
47. Kolonics A, Csiszovszki Z, Tőke ER, Lőrincz O, Haluszka D, Szipőcs R. (2014) In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy. *Exp Dermatol*, 23(8): p. 596-605.
48. De Giorgi V, Massi D, Sestini S, Cicchi R, Pavone FS, Lotti T. (2009) Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23(3): p. 314-6.
49. Paoli J, Smedh M, Wennberg AM, Ericson MB. (2008) Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics. *J Invest Dermatol*, 128(5): p. 1248-55.
50. Balu M, Kelly KM, Zachary CB, Harris RM, Krasieva TB, König K, Durkin AJ, Tromberg BJ. (2014) Distinguishing between Benign and Malignant Melanocytic Nevi by In Vivo Multiphoton Microscopy. *Cancer Research*, 74(10): p. 2688-2697.
51. Seidenari S, Arginelli F, Bassoli S, Cautela J, Cesinaro AM, Guanti M, Guardoli D, Magnoni C, Manfredini M, Ponti G, König K. (2013) Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol*, 19(1): p. e297-304.
52. Dimitrow E, Ziemer M, Koehler MJ, Norgauer J, König K, Elsner P, Kaatz M. (2009) Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, 129(7): p. 1752-8.
53. Choi YH, Kim D, Hwang E, Kim BJ. (2014) Skin texture aging trend analysis using dermoscopy images. *Skin Research and Technology*, 20(4): p. 486-497.
54. Hamer MA, Jacobs LC, Lall JS, Wollstein A, Hollestein LM, Rae AR, Gossage KW, Hofman A, Liu F, Kayser M, Nijsten T, Gunn DA. (2015) Validation of image analysis techniques to measure skin aging features from facial photographs. *Skin Res Technol*, Jan 20. doi: 10.1111/srt.12205
55. Kikuchi K, Masuda Y, Yamashita T, Kawai E, Hirao T. (2015) Image analysis of skin color heterogeneity focusing on skin chromophores and the age-related changes in facial skin. *Skin Res Technol*, 21(2): p. 175-83.
56. Koehler MJ, Hahn S, Preller A, Elsner P, Ziemer M, Bauer A, König K, Bückle R, Fluhr JW, Kaatz M. (2008) Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network. *Exp Dermatol*, 17(6): p. 519-23.

57. Gkogkolou P, Böhm M. (2012) Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol*, 4(3): p. 259-70.
58. Brownlee M. (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*, 46: p. 223-34.
59. Henle T, Deppisch R, Ritz E. (1996) The Maillard reaction--from food chemistry to uraemia research. *Nephrol Dial Transplant*, 11(9): p. 1718-22.
60. Münch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. (1997) Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 23(1-2): p. 134-43.
61. Beisswenger PJ, Howell S, Mackenzie T, Corstjens H, Muizzuddin N, Matsui MS. (2012) Two fluorescent wavelengths, 440(ex)/520(em) nm and 370(ex)/440(em) nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes. *Diabetes Technol Ther*, 14(3): p. 285-92.
62. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW, Gans RO, Smit AJ. (2004) Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*, 47(7): p. 1324-30.
63. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, Smit AJ. (2006) Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006. 29(12): p. 2654-9.
64. Tseng JY, Ghazaryan AA, Lo W, Chen YF, Hovhannisyan V, Chen SJ, Tan HY, Dong CY. (2010) Multiphoton spectral microscopy for imaging and quantification of tissue glycation. *Biomed Opt Express*, 2(2): p. 218-30.
65. Ghazaryan AA¹, Hu PS, Chen SJ, Tan HY, Dong CY. (2012) Spatial and temporal analysis of skin glycation by the use of multiphoton microscopy and spectroscopy. *J Dermatol Sci*, 65(3): p. 189-95.
66. Thrassivoulou C, Virich G, Krenacs T, Korom I, Becker DL. (2011) Optical delineation of human malignant melanoma using second harmonic imaging of collagen. *Biomed Opt Express*, 2(5): p. 1282-95.
67. Kershaw EE, Flier JS. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6): p. 2548-56.
68. Scherer PE. (2006) Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*, 55(6): p. 1537-45.
69. Federation ID. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 2005.

70. Arner P. (2005) Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Curr Mol Med*, 5(3): p. 333-9.
71. Leibel RL, Bahary N, Friedman JM. (1990) Genetic variation and nutrition in obesity: approaches to the molecular genetics of obesity. *World Rev Nutr Diet*, 63: p. 90-101.
72. Farooqi S, O'Rahilly (2006) Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev*, 27(7): p. 710-18.
73. Ichihara S, Yamada Y. (2008) *Genetic factors for human obesity*. *Cell Mol Life Sci*, 65(7-8): p. 1086-98.
74. Vamos EP, Kopp MS, Keszei A, Novak M, Mucsi I. (2007) The prevalence of diabetes in a large representative Hungarian population sample. *Diabetologia*, 50: p. S162-S163.
75. Jermendy Gy, Nádas J, Szigethy E, Széles Gy, Hidvégi T, Paragh Gy, Ádány R. (2008) A cukorbetegség és az emelkedett éhomi vércukor prevalenciája a hazai felnőttkorú (20-69 éves) lakosság körében: reprezentatív keresztmetszeti szűrővizsgálat eredményei. *Magyar Belorv Arch*, 61: p. 203-207.
76. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5): p. 1047-53.
77. Reiber GE. (2002) Epidemiology of diabetic foot ulcers and amputation: Evidence for prevention. *The evidence base for diabetes care*. Chichester, UK: Wiley.
78. Ezure T, Amano S (2011) Negative regulation of dermal fibroblasts by enlarged adipocytes through release of free fatty acids. *J Invest Dermatol*, 131(10): p. 2004-9.
79. Ezure T, Amano S (2010) Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol*, 19(10): p. 878-82.
80. Fu Y, Wang H, Shi R, Cheng JX. (2006) Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Express*, 14(9): p. 3942-51.
81. Fischer F, Volkmer B, Puschmann S, Greinert R, Breitbart E, Kiefer J, Wepf R. Assessing the risk of skin damage due to femtosecond laser irradiation. *J Biophotonics*, 2008. 1(6): p. 470-7.

82. König K, So PT, Mantulin WW, Tromberg BJ, Gratton E.(1996) *Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress*. J Microsc, 183(Pt 3): p. 197-204.
83. König K, Becker TW, Fischer P, Riemann I, Halbhauer KJ. (1999) Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes. Opt Lett, 24(2): p. 113-5.
84. de Gruijl FR, Rebel H.(2008) Early events in UV carcinogenesis--DNA damage, target cells and mutant p53 foci. Photochem Photobiol, 84(2): p. 382-7.
85. König K, So PT, Mantulin WW, Gratton E.(1997) Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes. Opt Lett, 22(2): p. 135-6.
86. Hopt A, Neher E. (2001) Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. Biophys J, 80(4): p. 2029-36.
87. Meldrum RA, Botchway SW, Wharton CW, Hirst GJ. (2003) Nanoscale spatial induction of ultraviolet photoproducts in cellular DNA by three-photon near-infrared absorption. EMBO Rep, 4(12): p. 1144-9.
88. Kong X, Mohanty SK, Stephens J, Heale JT, Gomez-Godinez V, Shi LZ, Kim JS, Yokomori K, Berns MW. (2009) Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. Nucleic Acids Res, 37(9): p. e68.
89. Träutlein D, Deibler M, Leitenstorfer A, Ferrando-May E.(2010) Specific local induction of DNA strand breaks by infrared multi-photon absorption. Nucleic Acids Res, 38(3): p. e14.
90. Fischer F, Volkmer B, Puschmann S, Greinert R, Breitbart W, Kiefer J, Wepf J. (2006) Skin imaged by femtosecond laser irradiation: a risk assessment for in vivo applications. Biophotonics and New Therapy Frontiers
91. Masters BR, So PT, Buehler C, Barry N, Sutin JD, Mantulin WW, Gratton E. (2004) Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging. J Biomed Opt, 2004. 9(6): p. 1265-70.
92. Flusberg BA, Jung JC, Cocker ED, Anderson EP, Schnitzer MJ. (2005) In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope. Optics Letters, 30(17): p. 2272-2274.
93. Bao H, Allen J, Pattie R, Vance R, Gu M. (2008) Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a 475 microm x 475 microm field of view for in vivo imaging. Opt Lett, 33(12): p. 1333-5.

94. Lee MY, Shin MC, Yang VC. (2013) Transcutaneous antigen delivery system. *BMB Rep*,46(1): p. 17-24.
95. Li N, Peng LH, Chen X, Nakagawa S, Gao JQ. (2011) Transcutaneous vaccines: novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers. *Vaccine*, 29(37): p. 6179-90.
96. Sieg A, Wascotte V. (2009) Diagnostic and therapeutic applications of iontophoresis. *J Drug Target*, 17(9): p. 690-700.
97. Charoo NA, Rahman Z, Repka MA, Murthy SN. (2010) Electroporation: an avenue for transdermal drug delivery. *Curr Drug Deliv*, 7(2): p. 125-36.
98. Vrdoljak A, McGrath MG, Carey JB, Draper SJ, Hill AV, O'Mahony C, Crean AM, Moore AC. (2012) Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines. *J Control Release*, 159(1): p. 34-42.
99. Polat BE, Hart D, Langer R, Blankschtein D. (2011) Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: mechanisms, scope, and emerging trends. *J Control Release*, 152(3): p. 330-48.
100. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. (2005) Dynamics and function of langerhans cells in vivo: Dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating langerhans cells. *Immunity*, 22(5): p. 643-654.
101. Haluszka D, Lőrincz K, Molnár G, Tamás G, Kolonics A, Szipőcs R, Kárpáti S, Wikonkál NM. (2015) In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-stokes raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit. *Microscopy Research and Technique*, 78(9): p. 823-830.
102. Szipőcs R. (2012) Új, fluoreszcens jelölés mentes, 3D mikroszkópiás képalkotó eljárás in vivo diagnosztikai vizsgálatokhoz. *Innotéka augusztus-szeptember*: p. 14-15.
103. Harrison, D.E., J.R. Archer, and C.M. Astle, *Effects of food restriction on aging: separation of food intake and adiposity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(6): p. 1835-8.
104. Oimomi M, Sakai M, Ohara T, Igaki N, Nakamichi T, Nishimoto S, Hata F, Baba S. (1989) The effect of fructose on collagen glycation. *Kobe J Med Sci*, 1989. 35(4): p. 195-200.
105. Levi B, Werman MJ. (1998) Werman, Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J Nutr*, 128(9): p. 1442-9.

106. König K, Ehlers A, Stracke F, Riemann I. (2006) In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography. *Skin Pharmacol Physiol*, 19(2): p. 78-88.
107. Norlen L. (2001) Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol*, 117(4): p. 830-6.
108. Mezei M, Gulasekharam V. (1980) Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci*, 26(18): p. 1473-7.
109. Carrer DC, Vermehren C, Bagatolli LA. (2008) Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: a two photon microscopy study. *J Control Release*, 132(1): p. 12-20.
110. Garrett NL, Lalatsa A, Uchegbu I, Schätzlein A, Moger J. (2012) Exploring uptake mechanisms of oral nanomedicines using multimodal nonlinear optical microscopy. *J Biophotonics*, 5(5-6): p. 458-68.
111. Newman MD, Stotland M, Ellis JI. (2009) The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *J Am Acad Dermatol*, 61(4): p. 685-92.
112. Jeng HA, Swanson J. (2006) Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 41(12): p. 2699-711.
113. Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. (2007) Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol Physiol*, 20(3): p. 148-54.
114. Graf BW1, Chaney EJ, Marjanovic M, De Lisio M, Valero MC, Boppart MD, Boppart SA. (2013) In vivo imaging of immune cell dynamics in skin in response to zinc-oxide nanoparticle exposure. *Biomed Opt Express*, 4(10): p. 1817-28.
115. Ezure T, Amano S. (2011) Negative Regulation of Dermal Fibroblasts by Enlarged Adipocytes through Release of Free Fatty Acids. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10): p. 2004-2009.
116. van Kruijsdijk RC1, van der Wall E, Visseren FL. (2009) Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(10): p. 2569-78.
117. Brandon EL, Gu JW, Cantwell L, He Z, Wallace G, Hall JE. (2009) Obesity promotes melanoma tumor growth: role of leptin. *Cancer Biol Ther*, 2009. 8(19): p. 1871-9.

118. Malvi P, Chaube B, Pandey V, Vijayakumar MV, Boreddy PR, Mohammad N1, Singh SV, Bhat MK. (2015) Obesity induced rapid melanoma progression is reversed by orlistat treatment and dietary intervention: role of adipokines. *Mol Oncol*, 9(3): p. 689-703.
119. Pothiwala S, Qureshi AA, Li Y, Han J.(2012) Obesity and the incidence of skin cancer in US Caucasians. *Cancer Causes Control*, 23(5): p. 717-26.
120. Qi L, Qi X, Xiong H, Liu Q, Li J, Zhang Y, Ma X, Wu N, Liu Q, Feng L. (2014) Type 2 diabetes mellitus and risk of malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Iran J Public Health*, 43(7): p. 857-66.
121. Haluszka D, Lőrincz K, Bánvölgyi A, Gyöngyösi N, Szipocs R, Kárpáti S, Wikonkal NM, (2014) In vivo assessment of potential carcinogenicity of multi-photon microscopy as the function of wavelength in the near-infrared range, in 44th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. *Journal of Investigative Dermatology*: Copenhagen, Denmark.
122. Thomas G, Nadiarnykh O, van Voskuilen J, Hoy CL, Gerritsen HC, Sterenborg HJ. (2014) Estimating the risk of squamous cell cancer induction in skin following nonlinear optical imaging. *J Biophotonics*, 7(7): p. 492-505.
123. Fartasch M, Diepgen TL, Schmitt J, Drexler H. (2012) The Relationship Between Occupational Sun Exposure and Non-Melanoma Skin Cancer. *Deutsches Arzteblatt International*, 109(43): p. 715-U14.
124. Kavouras I, Gomez T, Chalbot MC. (2015) UVA and Cutaneous Melanoma Incidences: Spatial Patterns and Communities At Risk. *Journal of Environmental Health*, 77(9): p. 8-14.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

Kolonics A, Csiszovszki Zs, Tőke ER, Lőrincz O, **Haluszka D**, Szipőcs R. (2014) In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy. *Exp Dermatol*, 23(8): 596-605

Haluszka D, Lőrincz K, Csákányi A, Vass L, Krolopp Á, Kolonics A, Szipőcs R, Kárpáti S, Wikonkál N. (2015) Nemlineáris mikroszkópia alapjai és alkalmazási lehetőségei a dermatológiában. *Bőrgyógy Ven Sz*, 91(1): 34-39

Haluszka D, Lőrincz K, Molnár G, Tamás G, Kolonics A, Szipőcs R, Kárpáti S, Wikonkál NM. (2015) In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit. *Microsc Res Tech*, 78(9):823-830

9.2. Az értekezés témájától független publikációk

Lőrincz K, Bánvölgyi A, **Haluszka D**, Keszeg A, Márton D, Kuroli E, Szipőcs R, Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Kárpáti S, Wikonkál N. (2015) Hosszú távú PUVA kezelés bőroregítő hatásának vizsgálata egereken. *Bőrgyógy Ven Sz* 91(1): 18-22

Bognár P, Németh I, Mayer B, **Haluszka D**, Wikonkál NM, Ostorházi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pásztói M, Buzás EI, Szipőcs R, Kolonics A, Temesvári E, Kárpáti S. (2013) Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 134(1): 105-11

10. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Wikonkál Norbert Professzor Úrnak az évek alatt nyújtott önzetlen segítségéért, értékes szakmai tanácsaiért, támogatásáért, hogy optimizmusával és humorával mindig bátorított a nehéz időszakokban.

Hálával tartozom konzulensemnek Dr. Szipőcs Róbertnek (MTA Wigner FK), hogy megismertetett az olykor bonyolultnak tűnő képalkotó eszközök használatával és bevezetett az optikai tudományok alapjaiba, valamint a publikációk és a disszertáció javításában nyújtott áldozatos munkájáért.

Szeretnék köszönetet mondani Kárpáti Sarolta Professzor Asszonynak, hogy az intézetben lehetőséget biztosított a kutatási munkám kivitelezéséhez.

Szintén hálával tartozom Dr. Kolonics Attilának (MTA Wigner FK), hogy az első években segítségemre volt a projekthez tartozó alapvető technikák elsajátításában, amik nélkül nem jutottam volna el idáig.

Köszönetet szeretnék mondani munkatársaimnak Dr. Lőrincz Kendének, Dr. Gyöngyösi Nórának és Dr. Bánvölgyi Andrásnak a jó hangulatú közös munkákért, amik még jobban összekovácsoltak minket. Külön szeretném kiemelni közvetlen kollégámat Dr. Lőrincz Kendét, köszönöm az évek során nyújtott rengeteg segítséget, a hasznos beszélgetéseket, szakmai és baráti tanácsokat.

Szeretném megköszönni Dr. Hársing Judit főorvos asszonynak, Seres Istvánnának és Pujcseva Ivettnek a hisztológiai feldolgozással kapcsolatos áldozatos munkájukat. Köszönöm Dr. Kuroli Enikőnek a szövettani minták kiértékelésben és digitalizálásban nyújtott segítséget.

Ez úton is szeretnék köszönetet mondani az MTA Wigner Fizikai Kutatóintézetnek az anyagi támogatásért és munkatársainak, Csákány Attilának és Krolopp Ádámnak az *in vivo* kísérletek kivitelezéséhez szükséges műszaki és technikai segítségért.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni volt csoporttársaimnak: Kisvári Gábornak, Dr. Tuboly Eszternek, Dr. Garab Dénesnek, Dr. Horváth Ádámnak, Nagy Viktóriának és Tax Gábornak, akikre az együtt töltött egyetemi évek után is mindig

számíthatok és támogatnak. Hálával tartozom barátnőimnek, akikkel minden problémámat megoszthatom és főképp lelki kikapcsolódásomról gondoskodtak.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Családomnak, és imádott Férjemnek a bátorítást, támogatást, hogy mindvégig mellettem álltak.

A cikkben bemutatott eredményeket a Miniszterelnökséggel megkötött TECH-09-A2-2009-0134 számú szerződés támogatásával értük el.